

JESSICA LOBO ALBUQUERQUE

**INTERAÇÃO DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
COM CÉLULAS ESPERMÁTICAS BOVINA E A CORRELAÇÃO
COM PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO COMPLEXO 85**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A345i
2019 Lobo Albuquerque, Jéssica, 1992-
Interação de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
com células espermáticas bovina e a correlação com proteínas de
membrana do complexo 85 / Jéssica Lobo Albuquerque. –
Viçosa, MG, 2019.
xii, 47 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-45.

1. Paratuberculose. 2. Ruminantes. 3. Sêmen.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

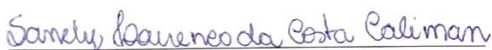
CDD 22. ed. 636.2089634


JESSICA LOBO ALBUQUERQUE


**INTERAÇÃO DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
COM CÉLULAS ESPERMÁTICAS BOVINA E A CORRELAÇÃO
COM PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO COMPLEXO 85**

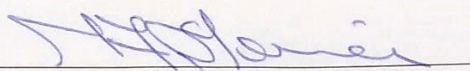
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2019.


Sanely Lourenço da Costa Caliman
(Coorientadora)


David Germano Gonçalves Schwarz
(Coorientador)


Leandro Licursi de Oliveira


Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

*“Ajuda-nos a entender como a vida é breve,
para que vivamos com sabedoria”*

Salmo 90:12

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, criador e sustentador de todas as coisas, que me sustenta e demonstra amor e cuidado a cada segundo da minha vida.

À minha mãe, Audineide, que é meu exemplo de garra e persistência e a minha irmã, Amanda, que traz alegria aos nossos dias. Amo vocês!

À professora Cidinha, por ser mais que uma orientadora e por estar sempre de portas abertas para nos receber. Obrigada por todos os puxões de orelha, ensinamentos e conselhos!

Aos companheiros de caminhada no LDBAC, Ilderlane, Isis, João Paulo, Junnia, Magna, Richard, Raquel, Sanely e Thaís. Obrigada por toda ajuda ao longo desses anos.

À Mari, pela amizade e por todos os ensinamentos, conselhos e ajuda dispensada a mim ao longo do mestrado.

Ao Tiago Zilch, pela grande ajuda no início deste trabalho. Obrigada por tornar mais fácil aquilo que eu não conhecia, pelos ensinamentos passados, pela dedicação para que desse certo, pelos sorrisos, pelos bolos e pelo carinho!

À equipe da Reprodução, em especial Edgar, Denise, Paula e JD, que me auxiliaram nas coletas e análises seminais e estavam sempre dispostos a tirarem minhas dúvidas.

Aos técnicos da preventiva, em especial Sr. Luiz e a Nívea por toda ajuda, disposição e auxílio no preparo do material durante esses anos.

Ao professor Renê Silva, pelo conhecimento, pelo auxílio e paciência para a realização da Microscopia de Varredura.

Ao Professor Yung-Fu Chang, da “College of Veterinary Medicine – Cornell University”, por ceder os clones, pelas sugestões e parceria neste projeto.

Ao professor Abelardo, por estar sempre disposto a esclarecer dúvidas e por nos auxiliar neste trabalho.

À Rosi, por ser mais que uma secretária e nos ajudar nas questões burocráticas do programa e estar sempre a um passo na nossa frente na resolução dos problemas.

Ao Gian, que prontamente nos cedeu os animais para a realização deste trabalho.

À comunidade IPV, em especial a família Valente, que me acolheu com tanto carinho em Viçosa, sendo um grande suporte nesta jornada.

Às minhas amigas Stela e Malu, por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos e me incentivarem a sempre continuar.

Ao Filipe, por ser um ombro amigo, pelo companheirismo e por deixar essa caminhada mais leve.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UFV.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado!

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Jéssica Lobo Albuquerque, filha de Audineide Barros Lobo, nasceu em 25 de agosto de 1992 em São Luis – Maranhão.

Em março de 2011 iniciou os estudos em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Maranhão, São Luís - MA, concluindo em dezembro de 2015.

Em março de 2017 ingressou no Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa-MG, nível de mestrado, sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, concluindo-o em fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Paratuberculose.....	2
2.2 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> e desordens reprodutivas.....	4
2.3 Proteínas do complexo 85 de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	6
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo Geral	8
3.2 Objetivos Específicos	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> e viabilidade.....	9
4.1.1. Diluições de MAP.....	9
4.1.2. Viabilidade de MAP pós congelamento de sêmen.....	10
4.2. Produção de anticorpos policlonais de proteínas do complexo 85 de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	10
4.2.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes 85A e 85B	10
4.2.1.1. SDS- PAGE e Western Blot.....	11
4.2.2. Imunização dos animais.....	11
4.3. Análise espermática e congelamento seminal.....	12
4.3.1 Coleta e característica do sêmen.....	12
4.3.2 Inoculação de MAP no sêmen e congelamento.....	13
4.3.3 Teste de Termo-resistência (TTR) antes e pós congelamento.....	13
4.3.4 Avaliação do potencial mitocondrial espermático.....	14
4.4. Interação de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> com células espermáticas.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1. Cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> e viabilidade.....	15
5.2. Produção de anticorpos policlonais de proteínas do complexo 85 de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	16

5.3. Avaliação do sêmen antes e pós congelamento.....	18
5.4. Interação de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> com células espermáticas.....	27
6. CONCLUSÃO.....	33
7. PERSPECTIVAS.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Aglomerados e bacilos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, corados através de coloração de Ziehl-Neelsen observados em microscópio optico..... 15
- Figura 2. Análise de expressão e purificação de proteínas do complexo 85 separadas por gel de SDS-poliacrilamida a 12% corado com Coomassie blue (A) ou imunotrasferidos com realização de western blot (B).....17
- Figura 3. Proteína 85A através de gel de SDS-poliacrilamida a 12% corado com Coomassie blue e western blot realizado com soro dos animais imunizados com antígeno 85A como anticorpo primário (A) e proteína 85B através de gel de SDS-poliacrilamida a 12% corado com Coomassie blue e western blot realizado com soro dos animais imunizados com antígeno 85B como anticorpo primário (B)..... 18
- Figura 4. Avaliação da motilidade e vigor, através do tempo, de sêmen bovino na presença de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (10^6 UFC/mL) e anticorpos das proteínas 85A e 85B antes do congelamento.....20
- Figura 5. Avaliação de motilidade e vigor pós congelamento, através do tempo, em sêmen bovino na presença de diferentes concentrações (UFC/mL) de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.....22
- Figura 6. Avaliação de motilidade e vigor pós congelamento, através do tempo, em sêmen bovino na presença de diferentes concentrações (UFC/mL) de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e anticorpo 85A.....23
- Figura 7. Avaliação de motilidade e vigor pós congelamento, através do tempo, em sêmen bovino na presença de diferentes concentrações de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e anticorpo 85B.....24
- Figura 8. Avaliação da atividade mitocondrial através de citometria de fluxo na presença de diferentes concentrações de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.....25

Figura 9.	Avaliação da atividade mitocondrial através de citometria de fluxo na presença de diferentes concentrações de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> e anticorpo 85A.....	25
Figura 10.	Avaliação da atividade mitocondrial através de citometria de fluxo na presença de diferentes concentrações de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> e anticorpo 85B.....	26
Figura 11.	Aglomerado de bacilos de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	27
Figura 12.	Interação de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> e espermatozoides bovinos em 1, 4 e 6 horas.....	29
Figura 13.	Interação de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> e espermatozoides bovinos em 1, 4 e 6 horas, na presença de anticorpo 85A.....	31
Figura 14.	Interação de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> e espermatozoides bovinos em 1, 4 e 6 horas, na presença de anticorpo 85B.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos testes físicos e morfológico realizados no sêmen do touro após coleta.....	19
---	----

RESUMO

ALBUQUERQUE, Jéssica Lobo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Interação de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* com células espermáticas bovina e a correlação com proteínas de membrana do complexo 85.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Abelardo Silva Junior, David Germano Gonçalves Schwarz e Sanely Lourenço da Costa Caliman.

A bactéria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente responsável pela doença de Johne ou paratuberculose caracterizada por uma enterite crônica, levando à diminuição da produção, descarte de animais, desordens reprodutivas e susceptibilidade a outras doenças, principalmente em ruminantes. Possui o complexo de antígenos 85, constituída por três proteínas 85A, 85B e 85C, presentes no envelope externo, responsável por ligar-se a fibronectina da célula hospedeira. MAP consegue sobreviver às baixas temperaturas da criopreservação, no entanto pouco se sabe da sua viabilidade e sua interação com os espermatozoides, de como esta bactéria pode alterar a viabilidade do material genético antes e pós-congelamento. Assim, este estudo propôs determinar características do espermatozoide bovino na presença de MAP e sua viabilidade pós congelamento bem como estudar esta interação. Foi utilizado um bovino apto para a reprodução para coleta de sêmen e foi inoculado concentrações de baixa e alta carga bacteriana de MAP, avaliando-se quanto a motilidade e vigor, potencial da atividade mitocondrial antes e pós congelamento, e interação de MAP com as células espermáticas através de microscopia de varredura. Além disso foi avaliado a viabilidade de diferentes concentrações de MAP pós congelamento. Foram produzidos anticorpos a partir de proteínas do complexo 85 de MAP (85A e 85B) e utilizados nestas análises. Foi possível determinar a viabilidade de MAP após a criopreservação em amostras de concentrações maiores, o que demonstra o potencial de transmissão deste patógeno através da inseminação artificial (IA). Observou-se que o sêmen bovino na presença de MAP apresenta diminuição na motilidade e vigor proporcional a concentração de MAP e que proteínas de membrana de MAP, 85A e 85B, podem estar relacionados a interação/adesão com as células espermáticas, que ocorre na cauda do espermatozoide principalmente na peça intermediária.

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Jéssica Lobo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine sperm cells and correlation with complex 85 membrane proteins.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-Advisers: Abelardo Silva Junior, David Germano Gonçalves Schwarz and Sanely Lourenço da Costa Caliman.

The bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is Johne's disease or paratuberculosis agent characterized by chronic enteritis, leading to decreased production, animal discard, reproductive disorders and susceptibility to other diseases, especially in ruminants. It has the complex 85 antigen, consisting of three proteins 85A, 85B and 85C, present in the external envelope, responsible for binding to fibronectin of the host cell. MAP can survive the low temperatures of cryopreservation, however little is known about its viability and its interaction with sperm, how this bacterium can alter the viability of the genetic material before and after freezing. Thus, this study proposed to determine characteristics of bovine spermatozoa in the presence of MAP and its viability after freezing as well as to study this interaction. A bovine was used for semen collection and low and high bacterial MAP concentrations were inoculated, evaluating the motility and vigor, potential mitochondrial activity before and after freezing, and MAP interaction with the cells spermatozoa by scanning microscopy. In addition, the viability of different concentrations of MAP after freezing was evaluated. Antibodies were produced from MAP complex 85 (85A and 85B) proteins and used in this analyzes. It was possible to determine the viability of MAP after cryopreservation in samples of higher concentrations, which demonstrates the potential of transmission of this pathogen through AI. It was observed that bovine semen in the presence of MAP shows decrease in motility and vigor proportional to MAP concentration and that MAP membrane proteins, 85A and 85B, may be related to the interaction / adhesion with sperm cells, which occurs in spermatozoa intermediate piece.

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente responsável pela Doença de Johne ou paratuberculose, caracterizada por uma enterite crônica que afeta principalmente os ruminantes. Por possuir uma parede celular rica em lipídios, característica das micobactérias, apresenta a capacidade de permanecer no ambiente mesmo quando estes são hostis. Sua transmissão acontece principalmente pela via fecal-oral, ocorrendo geralmente pela ingestão do agente no aleitamento pela cria, ou em outras fases da vida do animal ao ingerir alimento contaminado com fezes, sendo relatada também a possível transmissão venérea. É uma doença de distribuição mundial, que causa prejuízos econômicos grandes principalmente na indústria leiteira levando à diminuição da produção, descarte de animais, redução na fertilidade, susceptibilidade a outras doenças, além de causar uma preocupação sanitária por seu possível potencial zoonótico.

Possui importância socio-econômica no cenário internacional, pertencendo a lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) de enfermidades notificáveis em casos confirmados, cujo controle é imprescindível para o comércio de animais e alimentos de origem animal, além da exportação de material genético. Nas últimas décadas trabalhos demonstraram a distribuição do MAP em várias regiões brasileiras, sendo uma enfermidade preocupante também no panorama nacional, sendo incluída na lista de doenças que requerem notificação imediata de qualquer caso confirmado.

O Brasil ao longo dos últimos anos vem apresentando um expressivo crescimento na tecnificação dos rebanhos bovinos com aumento nas vendas de sêmen e utilização da inseminação artificial (IA), visando melhorar a genética dos rebanhos, diminuir custos com manutenção de reprodutores, bem como reduzir os riscos de disseminação de patógenos por contato sexual. Além disso houve também um aumento na exportação de material genético. Nesse contexto a inocuidade desse material é uma exigência que deve ser observada.

Alguns patógenos conseguem sobreviver às baixas temperaturas da criopreservação, dentre eles MAP. No entanto pouco se sabe da sua viabilidade nesse ambiente, da sua interação com os espermatozoides, e de como este pode alterar a viabilidade do material genético antes e pós-congelamento. Assim, este trabalho propõe-se trazer esclarecimentos a este respeito.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Paratuberculose

A doença de Johne ou paratuberculose é causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, um bastonete intracelular facultativo, de aproximadamente 0,5 x 1,5 µm, Gram positivo, imóvel, não esporulado, aeróbico e fortemente álcool-ácido-resistente - BAAR (Castro e Trabulsi, 1999). A doença foi descrita pela primeira vez na Alemanha, em 1895, por Johne e Frothingam como uma forma atípica da tuberculose em um bovino com seis anos de idade, que apresentava perda de peso e diarreia crônica. Esta enfermidade é caracterizada por uma diarreia crônica profusa com excreção de bacilos nas fezes, possui várias fases até as manifestações clínicas podendo levar anos para que estas apareçam (Olsen et al., 2001). Dentre os sinais clínicos, os animais podem apresentar diarreia, edema submandibular, perda de peso apesar de apetite normal, desnutrição, emagrecimento, letargia e até morte (Gonda et al., 2007; Garcia e Shaloo, 2015).

A contaminação ocorre principalmente em animais jovens através de um ambiente de parto ou colostro/leite contaminado e raramente no útero. Bezerros dificilmente mostram sinais clínicos durante os primeiros dois anos de idade, ao passo que os sinais clínicos começam a aparecer em 2 a 6 anos de idade (OIE 2008).

A paratuberculose é descrita como uma enfermidade contagiosa, crônica e granulomatosa progressiva. Afeta principalmente o intestino delgado e outros órgãos como os linfonodos mesentéricos e hepáticos. Progride através de três fases: (i) os animais estão infectados mas não possuem qualquer sintomatologia clínica e sem excreção de bacilos; (ii) há excreção bacteriana intermitente, sem sinais clínicos característicos porém com perda da produtividade do rebanho, baixa fertilidade e mastite; (iii) apresentam diarreia grave, não responsiva a tratamentos, má absorção de nutrientes, perda de peso e em casos graves a morte (Cocito et al., 1994; Garcia e Shaloo, 2015). No entanto segundo Nielsen e Toft (2008) as manifestações clínicas estão relacionadas a diversos fatores, tais quais, dose infectante de MAP ingerida, susceptibilidade do hospedeiro e idade do animal quando este obteve o contato com o patógeno.

A fase subclínica pode durar de dois até cinco anos, dificultando a detecção dos animais infectados no rebanho, com proliferação de MAP no intestino e linfonodos mesentéricos, podendo se espalhar por todo o corpo, sendo em ruminantes a junção ileocecal o foco da patologia e geralmente há a formação de granulomas, enterite

granulomatosa difusa com espessamento das mucosas devido a um grande número de macrófagos que se infiltram. Estima-se que cerca de 30 a 50% do rebanho mundial está infectado (Allen, 1998; Behr e Collins, 2010).

A epidemiologia da doença tem sido descrita em vários países, afetando os ruminantes domésticos (bovinos, ovinos, caprinos e búfalos) e os ruminantes silvestres (camelos, veados, lhamas, alces, renas, alpacas). No entanto já foi descrita em outros mamíferos como cavalos, porcos, coelhos, furões, lebres, texugos, raposas e doninhas (Behr e Collins, 2010; Garcia e Shaloo, 2015). Vem sendo estudado o seu potencial zoonótico, que não está totalmente estabelecido, porém relacionado com a etiologia da doença de Chron como seu agente causador, ou um dos fatores de uma síndrome multietiológica (Hermon-Taylor, 2000), levantando preocupações sobre a segurança de produtos lácteos, priorizando o controle da enfermidade em ruminantes, principalmente gado leiteiro (Ghadiali et al., 2004; Naser et al., 2004).

Os testes mais utilizados para a identificação de animais infectados, empregados para estimar a prevalência e em programas de controle de doenças são a cultura fecal (individual e amostras fecais combinadas), ELISA sérico e de leite (Barrett et al., 2011). O PCR fecal pode ser utilizado como teste confirmatório (Clark et al., 2008). Em geral, em relação a sensibilidade, a cultura fecal e PCR são superiores ao teste de ELISA para a identificação de animais infectados por MAP (Garcia e Shaloo, 2015), no entanto o cultivo é uma técnica demorada para obtenção de resultados.

O grande entrave no controle e possível erradicação da paratuberculose é a dificuldade de identificar os animais que estão contaminados com MAP em fases iniciais da infecção. Isto ocorre por causa do período pré-patente prolongado da infecção, a natureza predominantemente subclínica da doença e falta de testes para a detecção precoce e precisa de animais sub-clinicamente infectados (OIE 2008). Segundo Whitlock e Buergelt (1996), um animal em estágio clínico tem potencial para infectar mais 25 animais, no entanto a transmissão irá depender de vários fatores, como o contato próximo de animais.

Rebanhos leiteiros são os mais afetados, pois o ambiente de confinamento oferece estas condições favoráveis para a propagação do patógeno entre os animais, além destes possuírem um tempo de vida maior, em comparação ao gado de corte, e a paratuberculose possuir uma natureza lentamente progressiva (Nielsen e Toft, 2008; OIE, 2008).

As perdas econômicas provocadas pela paratuberculose são grandiosas, principalmente como resultado o aumento de abate prematuro, diminuição da produção de leite, redução na eficiência da conversão alimentar, problemas de fertilidade, redução dos valores de abate e maior susceptibilidade a outras doenças (Garcia e Shaloo, 2015). O prejuízo anual da paratuberculose no Canadá, por exemplo, foi de cerca de 15 milhões de dólares quando a prevalência era de 7% e de cerca de 250 milhões de dólares nos Estados Unidos quando a prevalência foi de aproximadamente 22% (Cho et al. 2013).

A paratuberculose já foi descrita em vários estados do Brasil, sendo encontrada em bovinos, bubalinos e pequenos ruminantes (Yamasaki et al, 2013), mas as perdas produtivas não são quantificadas oficialmente e não há um programa de controle voltado para a paratuberculose no Brasil, embora esteja enfrentando nos últimos anos obstáculos para exportação de produtos, inclusive sêmen e embriões bovinos¹. Em 2013, a paratuberculose entrou para a lista de doenças que requerem notificação imediata de qualquer caso confirmado (Brasil, 2013), demonstrando assim a sua importância nos rebanhos brasileiros.

2.2 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e desordens reprodutivas

O bacilo de MAP já foi detectado em órgãos genitais e no sêmen dos touros infectados através de cultura ou PCR, sendo que este micro-organismo sobrevive aos antibióticos utilizados na congelação do sêmen bem como a baixas temperaturas em nitrogênio líquido. Assim a exposição à contaminação intrauterina pode ocorrer (Larsen et al., 1981; Ayele et al 2004).

Merkal et al. (1981), relatam que uma pequena quantidade de MAP no sêmen de um touro pode ser suficiente para causar hipersensibilidade em uma vaca receptora, pois há infiltração de células inflamatórias e lesões no endométrio quando observado em vacas e cobaias que foram inoculadas intrauterinas com MAP, representando uma resposta inflamatória à bactéria, podendo resultar em abortos e diminuição da fertilidade.

Khol et al. (2010) avaliando um animal clinicamente com paratuberculose, conseguiu detectar MAP através de PCR em todas as amostras de sêmen coletadas

¹ MOREIRA, M.A.S., comunicação pessoal.

e recuperar através de cultivo em amostras de biopsia do epidídimo e glândulas vesiculares.

Barrett et al. (2006) observaram um aumento significativo nas taxas de abate devido à infertilidade em um rebanho irlandês com paratuberculose. O abate prematuro e o aumento da mortalidade por causa da paratuberculose, incorre em custos associados ao aumento de substituições, a perda de animais e a perda do potencial da genética nos rebanhos (Sorge et al., 2010).

A IA é uma biotécnica bastante difundida mundialmente por possuir vantagens principalmente quando associada à nutrição e sanidade adequadas, trazendo vários benefícios ao produtor, como o melhoramento genético e melhor controle e previsão de partos (Hafez e Hafez, 2004). Assim para que ocorra a exportação de células germinativas (sêmen e embriões), estes devem ser livres de patógenos, dentre eles MAP (Eppleston e Whittington, 2001) embora não entre na lista de doenças a serem obrigatoriamente diagnosticadas.

Em estudo pioneiro realizado anteriormente no Laboratório de Doenças Bacterianas – UFV, Faria, (2017) constatou que a interação do MAP com o espermatozoide ocorre na porção da peça intermediária, levando a procurar neste trabalho sobre os possíveis motivos para que a interação ocorra.

A membrana plasmática do espermatozoide é contínua em toda sua superfície, no entanto sua natureza difere regionalmente sendo formada por proteínas e lipídios (Khosro Beygi e Zarghami, 2007). A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide é separada da membrana plasmática da peça intermediária pelo anel posterior, e a membrana da peça intermediária é separada da membrana do flagelo pelo anel anular. Estes diferentes domínios contêm variadas concentrações e distribuições de partículas intramembranas (Flesch e Gadella, 2000).

Na peça intermediária estão localizadas as mitocôndrias que é uma organela presente em todos os tipos celulares que geralmente apresenta-se em formato esférico ou helicoidal (no caso do espermatozoide), e está localizada nas regiões celulares onde a demanda energética é maior (Alberts et al., 1999). As mitocôndrias são as principais células produtoras de energia oxidativa através da produção de ATP via cadeia de transporte de elétrons ou via glicólise sendo o ATP o suplemento energético para os batimentos flagelares, a hiper-ativação e a penetração do espermatozoide no oócito (Connell et al., 2002; Silva e Gadella, 2006). Além disso,

um dos componentes da membrana externa destas células é a fibronectina (Fn), sendo que em maior quantidade na cauda do espermatozoide (Pinke et al., 1997).

2.3 Proteínas do complexo 85 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Assim como *Mycobacterium tuberculosis*, MAP secreta proteínas relevantes com potencial antigênico. Entre os produtos secretados, está o complexo de antígenos 85, uma família de 30 – 32 kDa, constituída por três proteínas 85A, 85B, 85C, presentes também na composição transmembranar. Este complexo constitui de 14 - 60% das proteínas secretadas pelas micobactérias. São responsáveis por ligar-se a fibronectina da célula hospedeira e capazes de estimular a fagocitose mediada pelo complemento através de seus sítios de ligação à fibronectina (Roche et al., 1994; Schorey et al., 1996; Rosseels et al., 2006)

Em ensaios de ligação do complexo 85 com fibronectina (FN), Kuo et al. (2011), constataram que há uma diminuição de 44,6% na ligação do Ag85B quando as células hospedeiras possuíam um nível reduzido de fibronectina. Além disso, Middleton et al., (2002) em um estudo de pré-incubação de cultura da mucosa respiratória humana cultivada com proteínas de ligação a FN, relataram que *Mycobacterium avium* e / ou a proteína Ag85B de *Mycobacterium bovis* reduziram significativamente o número de bactérias aderentes ao tecido, confirmando sua importância como molécula de adesão.

O complexo 85 possui atividade mycolyltransferase e catalisam a síntese do glicolípido mais abundante da parede celular das micobactérias, 6,6-dimicolato de trealose (TDM), sendo estes antígenos imunodominantes (Nagai et al, 1991; Wiker et al, 1992; Viale et al, 2014). Embora todos pertencentes ao complexo 85 tenham atividade de mycolyltransferase, há evidências de que a eficiência na qual essa reação é realizada difere entre as três proteínas (Belisle et al., 1997).

Estas proteínas de ligação à FN são antígenos importantes das micobactérias por induzirem fortes respostas imunes em ensaios realizados contra tuberculose e hanseníase tanto em camundongos quanto em humanos (Huygen et al., 1988; Wiker e Harboe, 1992). Leid et al., (2002) em estudos com bisontes americanos experimentalmente infectados com MAP, mostraram que o Ag85, era o maior antígeno produzido durante a infecção, detectado no soro em Western blot com anticorpos monoclonais específicos para Ag85 (MAbs).

Em comparação com as sequências das proteínas de *M. bovis*, as proteínas de MAP, 85A (MAP0216) possui 82% de similaridade, 85B (MAP1609c) 86% de similaridade e 85C (MAP3531c) 87% de similaridade (Dheenadhayalan et al., 2002).

O desenvolvimento de novos fármacos para paratuberculose dirigidos ao sítio catalítico do complexo 85 (Ronning et al., 2000) ou o desenvolvimento de uma vacina baseada em um minigene das regiões de ligação à FN pode ser promissor para o controle da Doença de Johne (Dheenadhayalan et al., 2002).

Estudos em modelo experimental em camundongos demonstraram que a proteína 85A induziu respostas imunológicas do tipo Th1 contra a tuberculose (Huygen et al., 1996) e que a proteína 85B de MAP pode servir como antígeno eficaz por estimular resposta imune do tipo Th1 e Th2 (Mullerad et al., 2002).

Dheenadhayalan et al. (2002) demonstraram através de análises de Western immunoblot do antígeno 85A, forte reatividade com soro de animais acometidos por paratuberculose, sugerindo assim que proteínas do complexo 85 podem ser liberadas no curso inicial da infecção, podendo ser responsáveis pelo estabelecimento da doença.

Ohara et al. (1997) relatam que a proteína 85B é a mais abundante proteína secretada pelo complexo 85 de MAP. O gene que expressa a proteína 85B têm sido utilizado em ensaios ou como vacina de DNA, vacinando com sucesso ratos e cobaias contra a tuberculose (Horwitz et al., 1995; Velaz-Faircloth et al., 1999; Hess et al., 2000), sugerindo assim que o 85B possa ser um candidato em potencial também contra a paratuberculose.

O estudo de membros individuais desse complexo ajudará a determinar os papéis individuais dessas proteínas na patogênese e na imunologia de infecções por micobactérias, bem como na síntese da parede celular das micobactérias (Armitige et al., 2000).

Assim, este trabalho tem por finalidade também estudar a interação das proteínas de membrana 85A e 85B frente as células espermáticas, visando compreender a interação entre MAP e estas células.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar características do espermatozoide bovino na presença de *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* e sua viabilidade pós congelamento bem como estudar esta interação.

3.2 Específicos

- Realizar análises espermáticas na presença de diferentes concentrações de MAP em intervalos pré-estabelecidos antes e pós congelamento do sêmen.
- Avaliar a viabilidade de MAP em diferentes concentrações presente no sêmen pós-congelamento.
- Verificar a ação de proteínas de membrana de MAP na interação com as células espermáticas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC) e Laboratório de Imunobiologia Veterinária (IMUNOVET) localizados no Departamento de Veterinária – DVT, Laboratório de Microscopia de Varredura localizado no Departamento de Física - DPF, Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia localizado no Departamento de Biologia - DBG (parecer CTNBio 4775/2015, anexo 1) e no Núcleo de Microscopia e Microanálises - NMM, todos localizados no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA) sob processo 78/2017 (Anexo 2).

4.1. Cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e viabilidade

4.1.1. Diluições de MAP

Foi utilizada a cepa padrão MAP K10 que estava congelada a -80°C em estoque na bacterioteca do LDBAC. Em tubo de propileno novo e estéril de 50mL contendo 5mL de meio líquido Middlebrok 7H9 (MD7H9) suplementado com Micobactina *J* ($2\ \mu\text{g}/\text{mL}$) e 10 % de Oleic Acid Dextrose-Catalase (OADC), foi adicionado uma alíquota de $120\ \mu\text{L}$ da cultura estoque e o tubo foi mantido sob agitação constante de $1200\times g$ a 37°C até a obtenção da turbidez do meio por aproximadamente 30 dias. Todo o conteúdo foi transferido para um frasco graduado de 250mL contendo 50mL do mesmo meio citado acima e incubado novamente a 37°C sob agitação constante até nova turbidez do meio visando obter um maior volume de cultura para utilização no experimento.

Foi utilizado como referência a densidade óptica de 0,5 (equivalente a 10^6 UFC/mL) a 600_{nm} em leitura no espectrofotômetro, previamente quantificado. Uma diluição seriada foi realizada para obter as concentrações 10^3 a 10^8 UFC/mL em meio líquido MD7H9, suplementado com Micobactina *J* e OADC. Foram utilizadas estas diluições, pois Eamens et al. (2008) classificaram os animais portadores da paratuberculose de acordo com a carga de MAP liberada nas fezes, sendo as concentrações 10^3 - 10^5 UFC/mL baixa carga bacteriana e 10^6 - 10^8 UFC/mL alta carga.

Para confirmar a presença de MAP na cultura foi realizado esfregaço em lâmina e coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), utilizando kit comercial, conforme manual de instruções do fabricante.

4.1.2. Viabilidade de MAP pós congelamento de sêmen

Transcorridos os 30 dias de congelamento, uma palheta contendo cada diluição de MAP inoculada ao sêmen (10^3 a 10^8 UFC/mL) foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 7 segundos e transferidas para dois microtubos estéril de 1.5 mL. Um microtubo foi destinado para o plaqueamento imediato o outro foi submetido a centrifugação por 15 min a $2.500\times g$, e o sedimento ressuspendido em 150 µl de cloridrato de hexadecil pyridinium (HPC) a 0,75% durante 5 h, centrifugado novamente e ressuspendido em 150 µl de água destilada autoclavada e por fim plaqueada. Essa metodologia foi adaptada de Ayele et al. (2005) a fim de diminuir a multiplicação de bactérias de crescimento rápido.

Após, 60 µL de cada diluição foi espalhada na superfície das placas, contendo meio sólido Middlebrook 7H11 Agar (MD7H11) suplementadas com Micobactina J (2µg/mL) e 10% de OADC, com o auxílio de alça de Drigalski.

As amostras foram plaqueadas em duplicata e incubadas em estufa microbiológica a 37°C até o surgimento das colônias características de MAP.

4.2. Produção de anticorpos policlonais de proteínas do complexo 85 de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*

4.2.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes 85A e 85B

Os clones utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo prof. Yung-Fu Chang, Cornell University, e sua caracterização previamente descrita por Dheenadhayalan et al (2002).

Foram utilizadas células competentes BL21, cultivadas em meio líquido Lúria Bertani com ampicilina (50 µg / mL) acrescido do mix composto por 20 µl de KCM 5X buffer, 60µl de água destilada autoclavada e 20µl de DNA, preparado com o DNA das proteínas 85A e 85B separadamente. Quando obtido a $DO_{600} = 0,6$ foi realizado a adição de 0,5 mM de isopropil-b-Dthiogalactopyranoside (IPTG). As culturas foram incubadas por 3 horas, 37 ° C a 180 rpm. As células foram centrifugadas a 4.500 rpm por 10 minutos a 4° C, descartando o sobrenadante. Depois foram lisadas através de ciclos de sonicação durante 3 minutos, centrifugadas a 4.500 rpm por 15 minutos separando fração solúvel e corpo de inclusão. (Mullerad et al., 2002; Cho et al., 2007).

Estas foram purificadas no sistema de cromatografia de fase líquida (ÄKTA PURE L.). A diálise foi realizada em Cassetes de diálise (Thermo Scientific™ Slide-A-Lyzer™ 3.5K) submetidos a soluções seriadas de uréia, PBS (pH 7,0) e glicerol a 20%, sob

agitação constante em agitador magnético. Todas as etapas foram acompanhadas através de SDS-PAGE 12% e Western blot.

4.2.1.1 SDS-PAGE e Western blot

As amostras de proteínas foram submetidas a separação através de gel de SDS-poliacrilamida a 12% em cuba de eletroforese vertical, usando o intervalo de voltagem de 80 – 90v para o gel de entrada e 120 – 140v para o gel de separação. Após a corrida, os géis foram corados por Cromassie Brilliant Blue ou transferidos eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose para realização do Western blot. O tamanho esperado das proteínas é de 30 – 32 kDa (Rosseels et al., 2006).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (Molico) a 5% e PBST (solução de fosfato salino adicionado de tween 20) *overnight*. Em seguida a membrana foi lavada três vezes com PBST e então incubada com anticorpo primário de coelho anti-His (1:6000) durante 3 horas, seguido de lavagem em PBST três vezes. A membrana então foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:10000), conforme a instrução do fabricante, durante 3 horas. Após esse período, a membrana foi lavada novamente com PBST e revelado com kit Diaminobenzidine (Invitrogen – Thermo Fisher®) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.2. Imunização dos animais

Foram utilizados seis coelhos divididos em dois grupos distintos, A e B. Os animais estavam acomodados no Coelhário experimental – DVT, em gaiolas individuais, com água e alimentação à vontade.

Seguiu-se recomendações de Burakova et. al, (2018) para escolha de adjuvantes e foi preparado 20 mL de cada solução para vacinação, cada uma na concentração de 150 µg de proteína purificada (85A e 85B) adicionadas a 10% de hidróxido de alumínio e 150 µg de saponina por mL.

O grupo A foi hiperimunizado com 1 mL da solução contendo 85A e o grupo B com 1 mL da solução 85B. Cada coelho foi imunizado três vezes, por via subcutânea, com intervalos de 15 dias. As amostras de sangue foram coletadas duas semanas após a última aplicação, com a eutanásia dos animais e o soro foi obtido mediante a centrifugação (Cho et al., 2007). As amostras de soro controle foram obtidas pré-imunização, através da coleta de 3 a 5 mL de sangue da veia auricular.

Para a análise do anti-soro, as proteínas purificadas foram separadas por SDS-PAGE a 12% e transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose. O Western blot foi realizado como descrito anteriormente, usando os anti-soro de coelho como anticorpo primário e anticorpo anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado com peroxidase (Sigma - Alderich®) como anticorpo secundário. (Peng et al., 2016)

4.3. Análise espermática e congelamento seminal

4.3.1. Coleta e características do sêmen

Um touro reprodutor da raça Nelore, com 1 ano de idade, pesando aproximadamente 500kg, o qual passou por exame clínico, físico e andrológico, foi utilizado como doador de sêmen para este experimento. Foram coletadas as fezes deste para realizar cultura microbiológica para MAP.

O animal foi mantido em tronco de contenção durante a coleta e foi realizada a tosa dos pêlos do prepúcio e higienização completa da região (prepúcio e pênis) com água destilada autoclavada e solução desinfetante de baixa toxicidade Kilol®-L (Quinabra, Brasil).

O sêmen foi obtido através de massagem das ampolas e vesículas seminais por palpação transretal. O ejaculado foi acondicionado em tubo de propileno estéril de 15mL devidamente protegido da luz com papel laminado e mantido a uma temperatura constante de 37°C em banho-maria. Uma gota de aproximadamente 10µL do sêmen foi colocada em uma lâmina previamente aquecidas em mesa aquecedora a 37°C para a avaliação das características de turbilhonamento, motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático, segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen (CBRA, 1998).

Após a verificação das características citadas, o sêmen foi diluído em uma solução crioprotetora comercial TRIS-gema Botu-Bov® (Botupharma, Brasil) na proporção de 1:1. O material seguiu para o laboratório LDBAC em recipiente térmico a fim de manter a temperatura de 37°C. A solução crioprotetora foi utilizada na mesma temperatura do sêmen para evitar choque térmico nas células espermáticas.

4.3.2. Inoculação de MAP no sêmen e congelamento

Com a chegada do sêmen no LDBAC, o mesmo foi mantido em banho-maria a 37° C e distribuído em microtubos de 1,5 mL adicionados de 50µL de cada diluição de

MAP (10^3 - 10^8 UFC/mL), além dos anticorpos 85A e 85B em titulação definida por Western blot. As soluções permaneceram cerca de 30 minutos em banho-maria a 37° C para que pudesse ocorrer algum tipo de interação antes do congelamento. Como controle foi utilizado a diluição padrão de sêmen e crioprotetor submetido as mesmas condições das outras amostras.

Em seguida as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL devidamente identificadas, lacradas por meio de calor e mantidas a 4°C em geladeira por 4 horas. Após a fase de equilíbrio térmico, as palhetas foram colocadas em caixa de isopor contendo uma lâmina de nitrogênio líquido em uma plataforma de metal a 5cm acima do nível do nitrogênio e permanecendo no vapor por 15 minutos. Ao final deste processo, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e colocadas em canisters permanecendo em botijão criobiológico por 30 dias a -196°C. Este período de 30 dias foi utilizado segundo Larsen et al (1970) que avaliou o efeito de antibióticos e da criopreservação sobre a viabilidade de MAP.

Após este período, uma palheta de sêmen foi descongelada em banho-maria a 37°C para o teste de termo-resistência, avaliando a motilidade progressiva e o vigor espermático.

4.3.3. Teste de Termo-resistência (TTR) antes e pós congelamento

Microtubos contendo sêmen na diluição de MAP a 10^6 UFC/mL permaneceram em banho-maria a 37°C para realização do TTR lento antes do congelamento. Uma alíquota de 10µL de cada amostra foi retirada e colocada em lâmina pré-aquecida e observada em microscópio óptico nos tempos de 30 minutos, 1, 3 e 5 horas. Foram avaliadas quanto a motilidade espermática progressiva retilínea (0 a 100%) e vigor espermático (0 a 5) (Dimitropoulos, 1967; Arruda et al., 1992).

Após o congelamento uma palheta de cada concentração (10^3 – 10^8 UFC/mL) e controle foi retirada do botijão de nitrogênio e colocada em banho-maria a 37° C e transferidas para microtubos para realização do TTR.

4.3.4. Avaliação do potencial mitocondrial espermático

A análise do potencial mitocondrial foi determinada de acordo com protocolo proposto por Ortega-Ferrusola et al. (2009) modificado. Uma alíquota de 500 µL de cada palheta foi descongelada e previamente diluída em meio PBS (5×10^6 espermatozoides/mL) foi incubada com 0,5 µL da sonda fluorescente JC-1, na

concentração de 153 μM , por 40 minutos em banho-maria a 37 °C. Após esse período, a amostra foi destinada à leitura no aparelho de citometria de fluxo. Nesta avaliação foram analisadas 10.000 células por amostra, com taxa de aproximadamente 200 células/segundo, com os filtros FL1 (JC-1 monômeros) e FL2 (JC-1 agregados) e excitação de 488nm.

4.4. Interação de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* com células espermáticas

Uma palheta contendo apenas o sêmen diluído (concentração de 30×10^6 espermatozoides por palheta) foi utilizada. Foram inoculados MAP a 10^6 UFC/mL em 240 μL de sêmen, divididos em três microtubos. Em um microtubo foi colocado o Ac 85A e em outro o Ac 85B, ambos na concentração determinada pelo Western blot. As amostras foram centrifugadas a $600 \times g$ por 8 minutos, lavadas em tampão fosfato-salino (PBS pH 7,0) e centrifugadas novamente após a lavagem. Foram adicionados 500 μL de meio líquido Middlebrok 7H9 (MD7H9), suplementado com Micobactina J (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 10 % de OADC, e incubadas a 37°C por 1, 4 e 6 horas em agitação constante a 200 rpm. A metodologia utilizada foi adaptada de Benchimol et al. (2008); Fraczek et al. (2011).

Para a realização da Microscopia eletrônica de varredura, aproximadamente 10 μL de cada amostra inoculadas nos períodos pré-determinados de 1, 4 e 6 horas de interação foram adicionadas em lamínulas circulares e previamente preparadas com solução de albumina a 1%. Após a secagem do material, as amostras foram lavadas em solução glutaraldeído 2,5% e em tampão cacodilato de sódio 0,05M. Uma série de desidratação em álcool 30, 50, 70, 80 e 90% por 10 minutos foi realizada, sendo a desidratação final em etanol 100% por 10 minutos repetidas três vezes. As lamínulas foram levadas ao secador de ponto crítico Balzers CPD 020, montagem em suporte de alumínio e cobertura com ouro em "sputtercoater" (Balzers SCA 010). O material foi analisado em microscópio eletrônico de varredura JEOL - JSM-6010LA em diferentes magnitudes de aumento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e viabilidade

Os esfregaços do cultivo, corados com coloração de Ziehl-Neelsen, confirmaram a presença de MAP, demonstrando bacilos Álcool - Ácido Resistente (BAAR) na figura 1. A obtenção da turbidez no volume utilizado neste trabalho, foi alcançada após aproximadamente 4 meses de cultivo, relembrando assim a natureza fastidiosa desta bactéria.

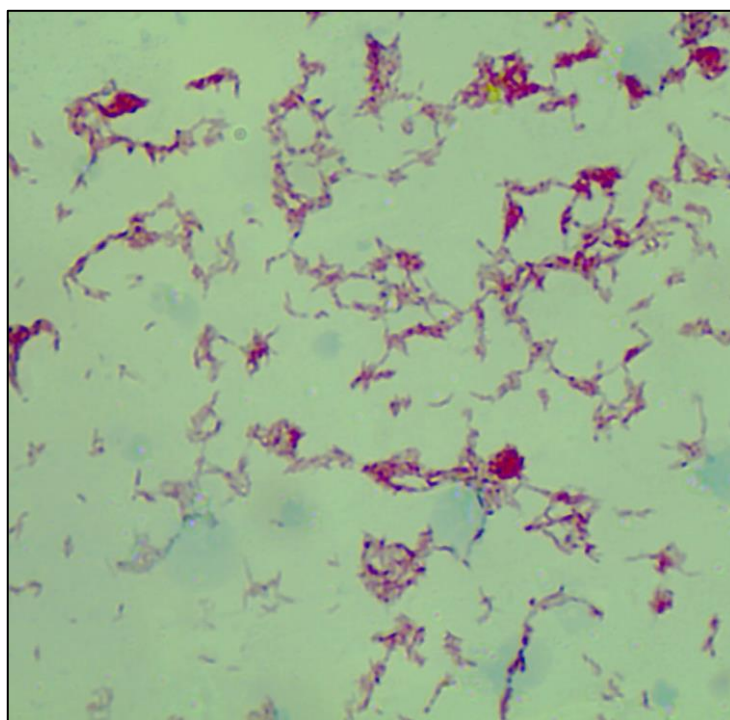


Figura 1. Aglomerados e bacilos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, corados através de coloração de Ziehl-Neelsen observados em microscópio óptico. Aumento 200x.

Das amostras provenientes de palhetas descongeladas plaqueadas para avaliação da viabilidade de MAP, as que não passaram por descontaminação com HPC 0,75%, apresentaram contaminações nas placas. O sêmen de animais clinicamente saudáveis não é estéreis, podendo conter bactérias de vários gêneros, como *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Escherichia coli*, em baixas concentrações (Wierzbowski 1981; Hare 1985). Em estudo realizado com sêmen *in natura* e congelado de touros e búfalos, Sannat et al. (2015) relataram a concentração de carga bacterinas entre $1,00 \times 10^1$ a $2,36 \times 10^4$ UFC/mL nas amostras analisadas.

Foram observadas colônias características de MAP após 15 semanas de incubação apenas no controle positivo, e em duas placas contendo maiores diluições (10^7 e 10^8 UFC/mL) de amostras tratadas com HPC a 0,75%.

O uso de HPC pode afetar diretamente a viabilidade de MAP em 70 - 99%, mesmo estando em diferentes concentrações de uso e diferentes concentrações de MAP, causando danos a célula bacteriana e diminuindo sua viabilidade (Grant et al., 2002; Whittington et al., 2003; Bradner et al., em 2013), podendo explicar a baixa recuperação de viabilidade de MAP observada no presente estudo. Embora com baixa recuperação, esse dado é importante pois MAP se torna um potencial patógeno a ser transmitido através de inseminação artificial.

5.2. Produção de anticorpos policlonais de proteínas do complexo 85 de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*

Para obtenção das proteínas 85A e 85B, o plasmídeo pET 32a foi induzido por IPTG e expresso em *E. coli*, com uma média de expressão de 0,42 mg/mL da proteína 85A e 2 mg/mL da proteína 85B.

Os resultados do SDS-PAGE confirmaram que as proteínas foram expressas estando presentes em corpos de inclusão das células transformadas, com os tamanhos entre 30 - 32 kDa (Figura 2) como o esperado segundo Rosseels et al., (2006). O sistema de expressão de proteínas em *E. coli* tem-se demonstrado como primeira escolha para análises de proteínas recombinantes, sendo o sistema de expressão pET um dos sistemas mais utilizados para a clonagem e expressão destas proteínas (Liu e Naismith, 2009).

Não foi observada nenhum tipo de reação adversa nos animais submetidos a vacinação, apresentando-se saudáveis e sem mudanças de comportamento.

Foi obtido o título por meio de Western blot utilizando os soros dos animais como anticorpo primário, chegando na titulação de 1:3000 para ambas as proteínas, sendo aquele em que se visualizou com maior nitidez as reações, e o anticorpo anti-IgG de coelho marcado com peroxidase como anticorpo secundário. Foi observada as bandas características marcadas, demonstrando assim que a imunização foi satisfatória, como observado na figura 3.

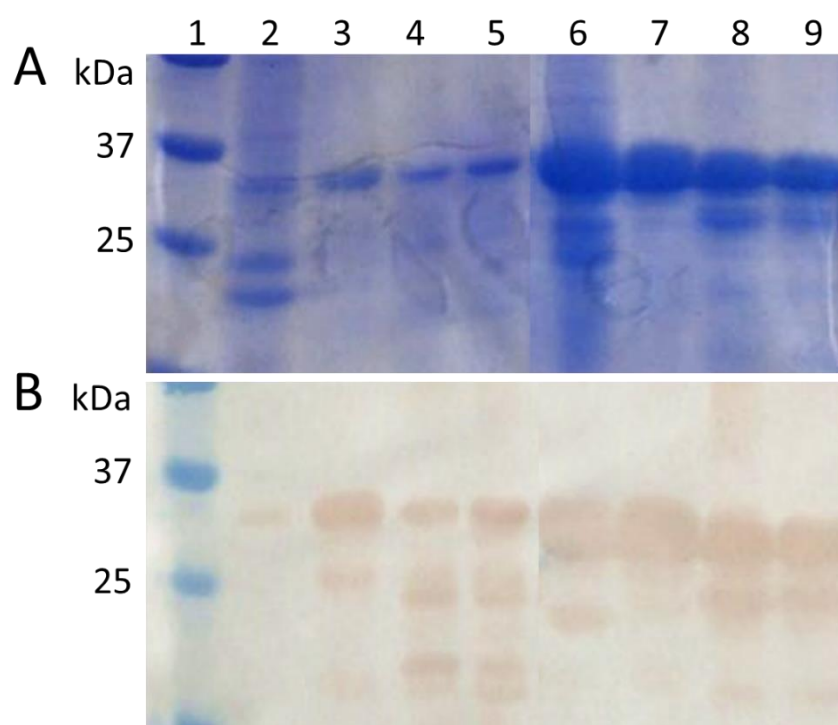


Figura 2. Análise da expressão, purificação e diálise de proteínas do complexo 85 separadas por gel de SDS-poliacrilamida a 12% corado com Coomassie blue **(A)** ou imunotransferidos com realização de western blot **(B)**. **1.** Marcador de peso molecular 10 – 250 kDa. **2.** Corpo de inclusão contendo a proteína 85A **3.** 85A presente na eluição. **4.** 85A após purificação **5.** 85A após diálise **6.** Corpo de inclusão contendo a proteína 85B **7.** 85B presente na eluição **8.** 85B após purificação **9.** 85B após diálise.

Os sais de alumínio são bastante utilizados em formulações de vacinas aos longos dos anos por sua facilidade e segurança na utilização, podendo induzir altos títulos de IgG, com uma resposta imune relativamente duradoura. Os adjuvantes de alumínio promovem a secreção de interleucina 4 (IL- 4) que estimula a resposta T helper 2 (Th2), resultando na produção de IgG1 e IgE e eosinófilos, sendo considerados assim bons candidatos para vacinas anti-bacterianas e anti-parasitárias (Gupta, 1998; Ulanova et al., 2000; HogenEsch, 2002).

Para melhorar a eficácia da resposta imune dos compostos de alumínio, uma das estratégias é utilizar uma coadministração com adjuvantes que estimulem as respostas mediadas por células Th1 (Burakova et al., 2018). Frações purificadas de *Quillaja saponaria*, as saponinas, são utilizadas em ensaios clínicos contra células cancerígenas humana e em vacinas. Estudos demonstram que as saponinas podem estimular a resposta mediada por células do tipo Th1 e linfócitos citotóxicos (Marciani

et al., 1991; Kensil, 1996; Zhu et al., 2015). Em camudongos, podem induzir a produção de IgG1 e IgG2 (Katayama et al., 1999).

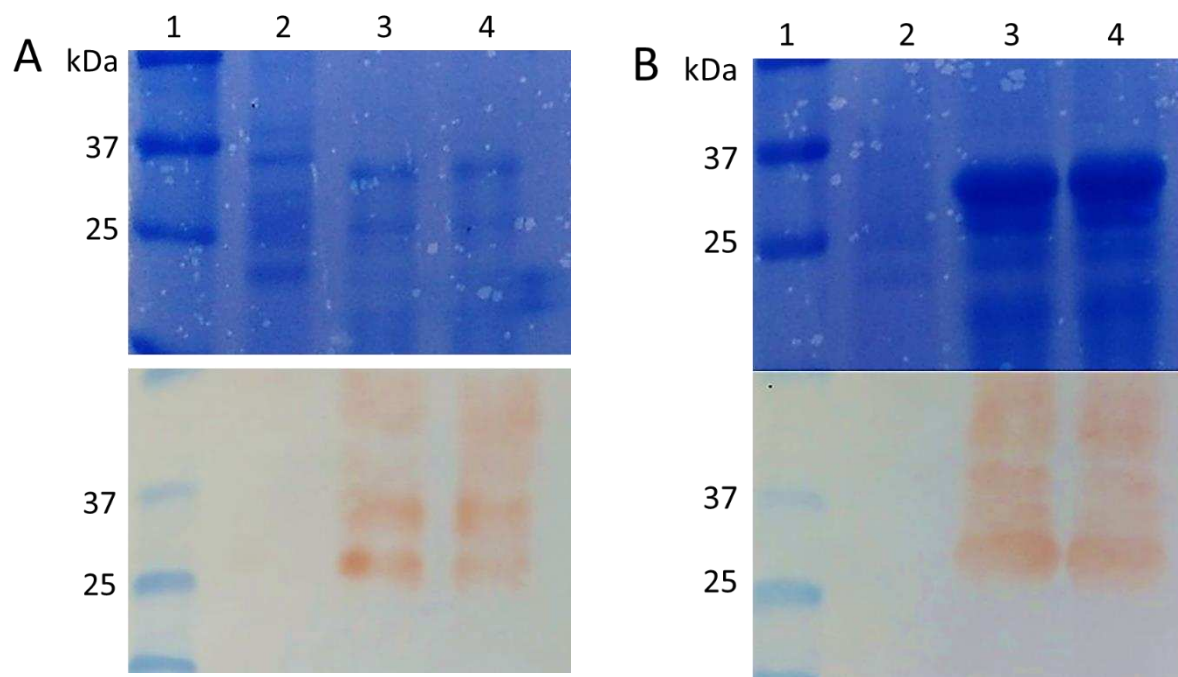


Figura 3. Proteína 85A através de gel de SDS-poliacrilamida a 12% corado com Coomassie blue e western blot realizado com soro dos coelhos imunizados com antígeno 85A como anticorpo primário **(A)** e proteína 85B através de gel de SDS-poliacrilamida a 12% corado com Coomassie blue e western blot realizado com soro dos coelhos imunizados com antígeno 85B como anticorpo primário **(B)**. **1.** Marcador de peso molecular 10 – 250 kDa. **2.** Célula BL21 não induzida **3 e 4.** Proteínas 85A / 85B expressas e marcadas no western blot.

Assim no presente estudo, a combinação de adjuvantes de sais de alumínio e saponinas demonstraram uma boa capacidade de auxiliar nas respostas imunológicas, obtendo os anticorpos necessários para os ensaios posteriores.

5.3. Avaliação do sêmen antes e pós congelamento

O touro utilizado neste trabalho apresentou-se saudável aos exames clínicos e andrológicos e negativo para MAP na realização do cultivo fecal.

O ejaculado apresentava concentração de $3,2 \times 10^9$ de espermatozoides viáveis, com aspecto leitoso, e os testes físicos e morfológicos estavam dentro dos padrões exigidos para seleção de reprodutores pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (1998), mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos testes físicos e morfológico realizados no sêmen do touro após coleta.

Teste (escore padrão)	Microscópio óptico Aumento X	Sêmen	CBRA*
Turbilhonamento (0-5)	100	2	-
Motilidade	100	85%	≥70%
Vigor (0-5)	400	3,5	≥3
Morfologia: sptz normais	100	94%	≥30%

*Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para Exame Andrológico e de Sêmen animal. 2ª edição., 1998.

Segundo Meyers (2007) parâmetros convencionais de sêmen como concentração, vitalidade, motilidade e morfologia, analisados por microscopia óptica, revelam de maneira parcial, a capacidade funcional do espermatozoide de fertilizar o oócito, sendo o sêmen utilizado neste estudo viável para o congelamento.

Para avaliação do comportamento do espermatozoide bovino frente a interação deste com MAP, foi avaliado quanto a motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático em um período pré-estabelecido antes do congelamento pelo TTR. Observou-se um comportamento de diminuição destes parâmetros quando MAP estava presente interagindo com o sêmen e em contrapartida uma otimização da motilidade e vigor quando os anticorpos estavam presentes (Figura 4).

A motilidade espermática é fundamental para que os espermatozoides alcancem o ambiente uterino e o local de fertilização, sendo o critério mais usado na avaliação de sêmen (Siqueira et al., 2007).

Estudos com a interação de bactérias e espermatozoides vem sendo descritos ao longo do tempo na literatura, sendo *Escherichia coli* a com mais estudos, possuindo efeito espermicida através da produção de toxinas, além de causar um decréscimo na motilidade das células espermáticas, de aumentar a aglutinação dessas células, como também interferir na longevidade espermática e fertilidade do rebanho (Althouse et al., 2000).

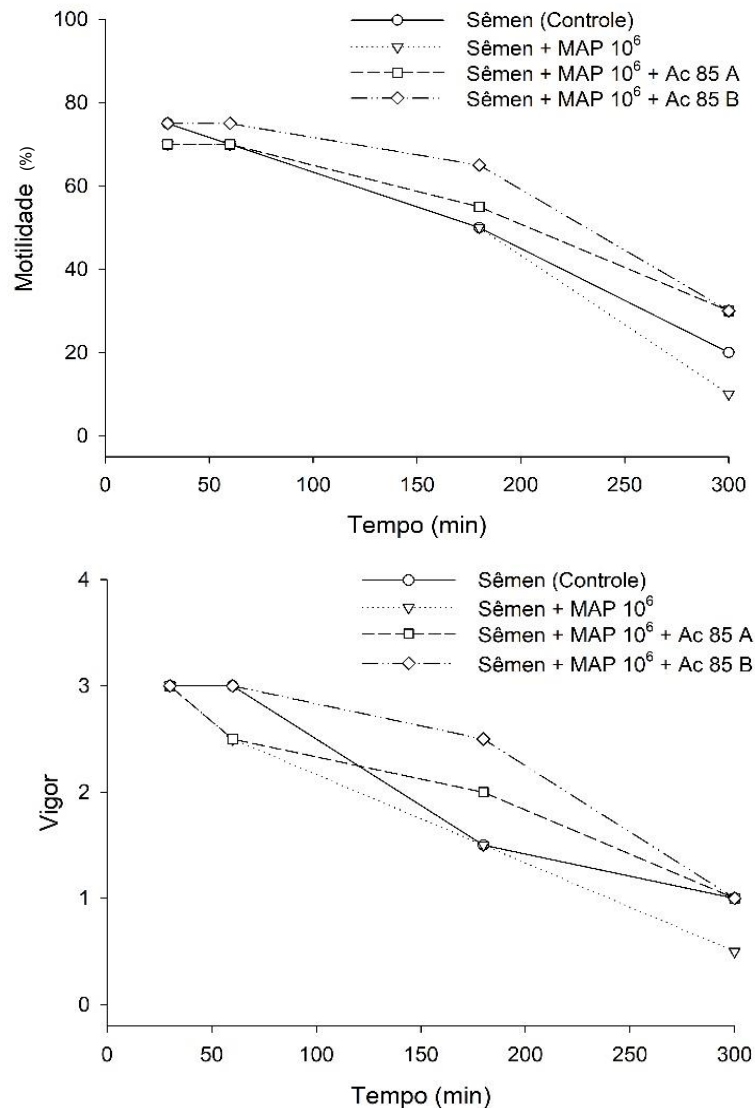


Figura 4. Avaliação da motilidade e vigor, através do tempo, de sêmen bovino na presença de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (10^6 UFC/mL) e anticorpos das proteínas 85A e 85B antes do congelamento.

Estudo utilizando cepas uropatogênicas em humanos de *E. coli*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Bacteroides ureolyticus*, levaram a alterações na estrutura da membrana plasmática dos espermatozoides e alterações em sua atividade mitocondrial. Estes microrganismos podem ser tóxicos à célula espermática levando a alterações morfológicas severas e consequências degenerativas graves. (Fraczek et al., 2011).

É importante ressaltar que de acordo com Peña-Martinez (2004), a presença de espermatozoides imóveis na amostra não implica que estejam mortos, pois alguns

estudos já indicaram a presença de células espermáticas imóveis após descongelamento embora possuíssem sua estrutura intacta. Assim, apesar da motilidade não ser um parâmetro indicativo preciso de mensuração de espermatozoides vivos ou mortos, fornece informação de um fator necessário para a capacidade fertilizante do espermatozoide, pois a motilidade é a manifestação de sua competência estrutural e funcional.

Imediatamente após a criopreservação, uma palheta de sêmen controle foi descongelada apresentando motilidade de 45% e vigor espermático 3, estando dentro dos padrões pós congelamento que são de $\geq 30\%$ de motilidade e ≥ 3 de vigor exigidos pelo CBRA (1998), demonstrando assim que o processo de congelamento realizado no experimento foi satisfatório.

Transcorridos os 30 dias de congelamento, uma palheta de cada diluição foi submetida ao TTR onde demonstrou-se, embora com diferenças pequenas, que quanto maiores as concentrações de MAP, menores os parâmetros de motilidade e vigor (figura 5).

Pinart et al.,(2016) estudando alterações causadas em espermatozoides de javali por bactérias *E. coli* e *Clostridium perfringens* relataram que, dentre vários fatores, o grau de alteração dos parâmetros espermáticos depende das espécies bacterianas e da dose infecciosa, sugerindo que existe um limiar de concentração de 10^7 UFC/mL em ambas bactérias, de modo que doses infecciosas iguais ou superiores comprometem grandemente a viabilidade espermática e a motilidade dos espermatozoides.

Foi possível observar no presente estudo que em altas concentrações bacterianas de MAP (10^6 a 10^8 UFC/mL) a motilidade do espermatozoide era de apenas de 5% caindo para 0% aos 60 minutos do TTR. Enquanto o controle negativo apresentava 45% no início caindo para 0% apenas após transcorridos 3 horas de teste. Observou-se que em baixas cargas bacterianas (10^3 a 10^5 UFC/mL) os espermatozoides apresentavam 10% de motilidade chegando à nulidade em uma hora de teste (Figura 5). Não existem trabalhos na literatura que estudaram a interação de MAP em diferentes concentrações no sêmen bovino, sendo esse um trabalho pioneiro.

A diminuição do vigor e da quantidade de células móveis ocorre pois estruturas que garantem sua sobrevivência, como flagelo e membrana plasmática, estão lesionadas podendo ser causada pelo próprio processo de criopreservação

(Coleghine et al., 2008) ou por presença de micro-organismos (Khol et al., 2010; Fraczek et al., 2012; Pinart et al., 2016), processo este observado no presente estudo.

Khol et al. (2010) estudando um animal em estágio clínico de paratuberculose, observou que a qualidade geral das amostras de sêmen coletadas eram ruins, a densidade do sêmen era baixa, a motilidade do sêmen diminuiu de 72 para 49% e a integridade da membrana diminuiu de 67 para 39%, nas últimas duas coletas respectivamente. Pode-se inferir que em estágios de paratuberculose, com maiores cargas bacterianas sendo excretadas, as alterações nos parâmetros dos espermatozoides são acentuadas devido a interação com MAP, resultando em alterações e danos na estrutura do espermatozoide.

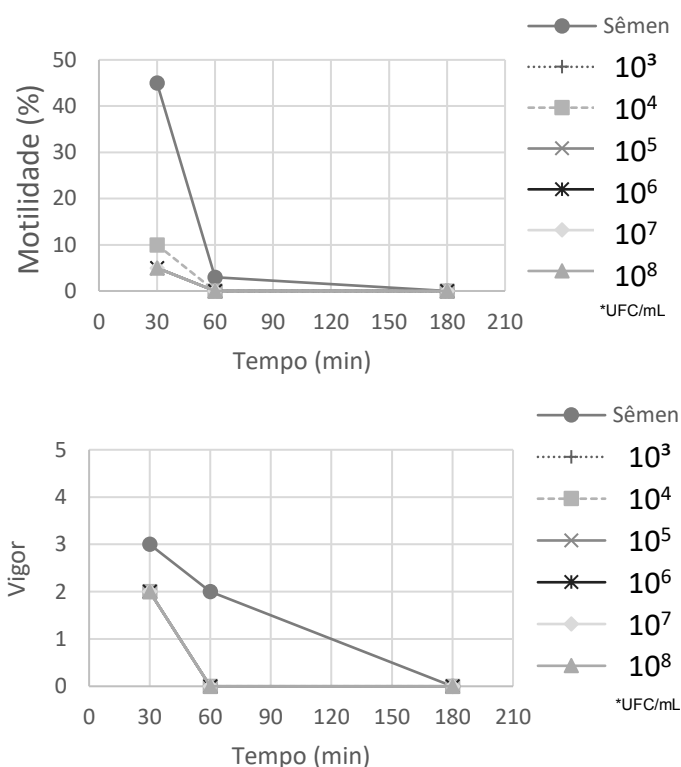


Figura 5. Avaliação de motilidade e vigor pós congelamento, através do tempo, em sêmen bovino na presença de diferentes concentrações (UFC/mL) de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Quando avaliado pós congelamento os parâmetros do sêmen na presença dos anticorpos 85A e 85B, foi observado um aumento destes parâmetros próximos ao controle negativo quando a concentração de MAP era menor, decrescendo à medida que aumentava a concentração de bactérias (figuras 6 e 7).

As proteínas de membrana do complexo 85, dentre elas 85A e 85B são responsáveis por ligar-se a fibronectina da célula hospedeira (Schorey et al., 1996;

Rosseels et al., 2006; Kuo et al., 2011). Em um estudo realizado por Pinke et al., (1997) visando estudar a localização da fibronectina (FN) no espermatóide humano, relatou que no teste de imunorreatividade a coloração na cauda do espermatóide foi consistentemente mais alta, enquanto a imunorreatividade de FN ao longo do acrossomo e da banda equatorial foi consistentemente mais baixa. Logo, infere-se que de acordo com os resultados obtidos essas proteínas estão estritamente relacionadas a adesão/interação de MAP com as células espermáticas.

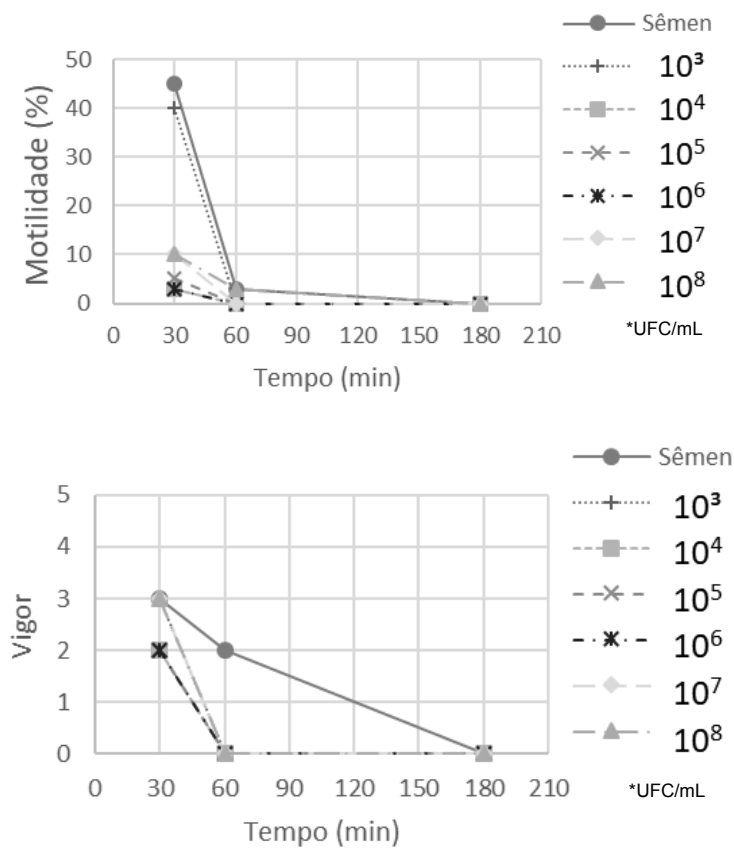


Figura 6. Avaliação de motilidade e vigor pós congelamento, através do tempo, em sêmen bovino na presença de diferentes concentrações (UFC/mL) de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e anticorpo 85A.

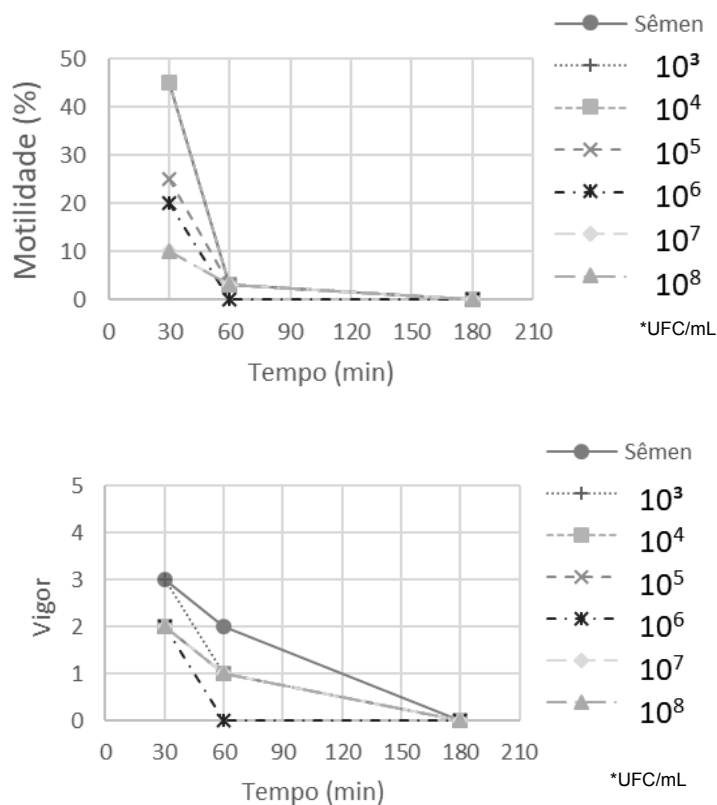


Figura 7. Avaliação de motilidade e vigor pós congelamento, através do tempo, em sêmen bovino na presença de diferentes concentrações de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e anticorpo 85B.

O potencial de membrana mitocondrial (MMP ou $\Delta\psi$) é o parâmetro que melhor reflete a função mitocondrial e é um indicador do estado energético celular. Pode ser usado para avaliar a atividade da cadeia respiratória e do sistema de transporte de elétrons (Paoli et al., 2011).

Ao avaliar o potencial mitocondrial através da citometria de fluxo neste estudo, não foi possível observar diferenças significativas entre o controle, as amostras contendo MAP, independente da concentração avaliada, na ausência ou na presença dos anticorpos (figuras 8, 9 e 10).

Na presença de patógenos no sêmen, é esperado que a a porcentagem de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial íntegro diminua, como acontece após a incubação com *E. coli*, além da diminuição da viabilidade e a motilidade dos espermatozoides (Schul et al., 2010). Fraczek et al. (2011) também demonstraram que a porcentagem de espermatozoides com alto $\Delta\Psi_m$ foi significativamente menor no grupo de células tratadas com *E. coli* ou com *B. ureolyticus* em relação ao controle.

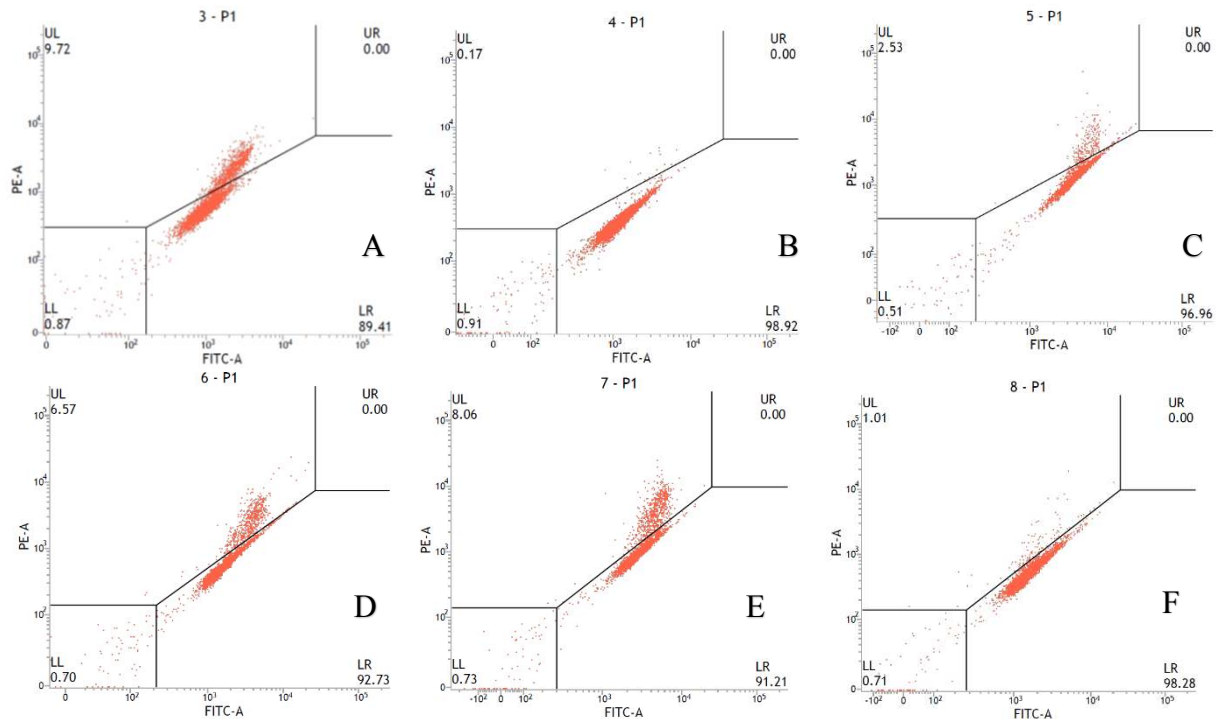


Figura 8. Avaliação da atividade mitocondrial através de citometria de fluxo na presença de diferentes concentrações de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. (A) 10^3 UFC/mL. (B) 10^4 UFC/mL. (C) 10^5 UFC/mL. (D) 10^6 UFC/mL. (E) 10^7 UFC/mL. (F) 10^8 UFC/mL.

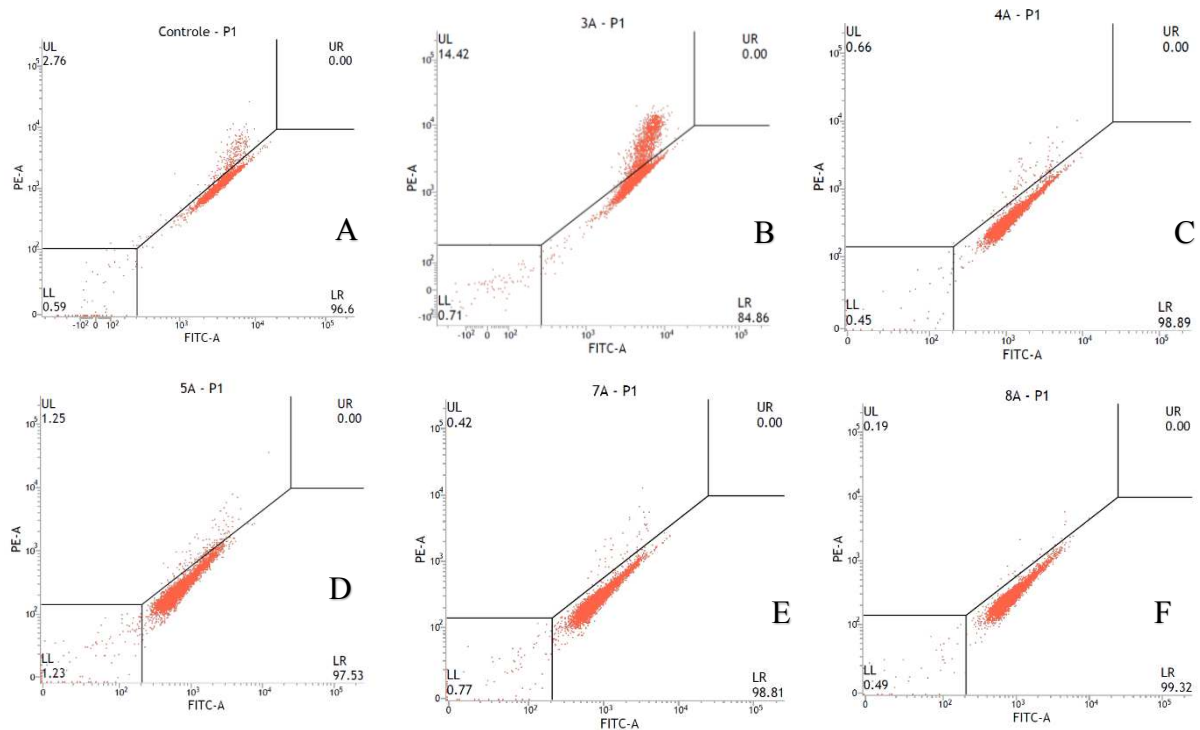


Figura 9. Avaliação da atividade mitocondrial através de citometria de fluxo na presença de diferentes concentrações de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e anticorpo 85A. (A) Controle negativo (B) 10^3 UFC/mL. (C) 10^4 UFC/mL. (D) 10^5 UFC/mL. (E) 10^7 UFC/mL. (F) 10^8 UFC/mL.

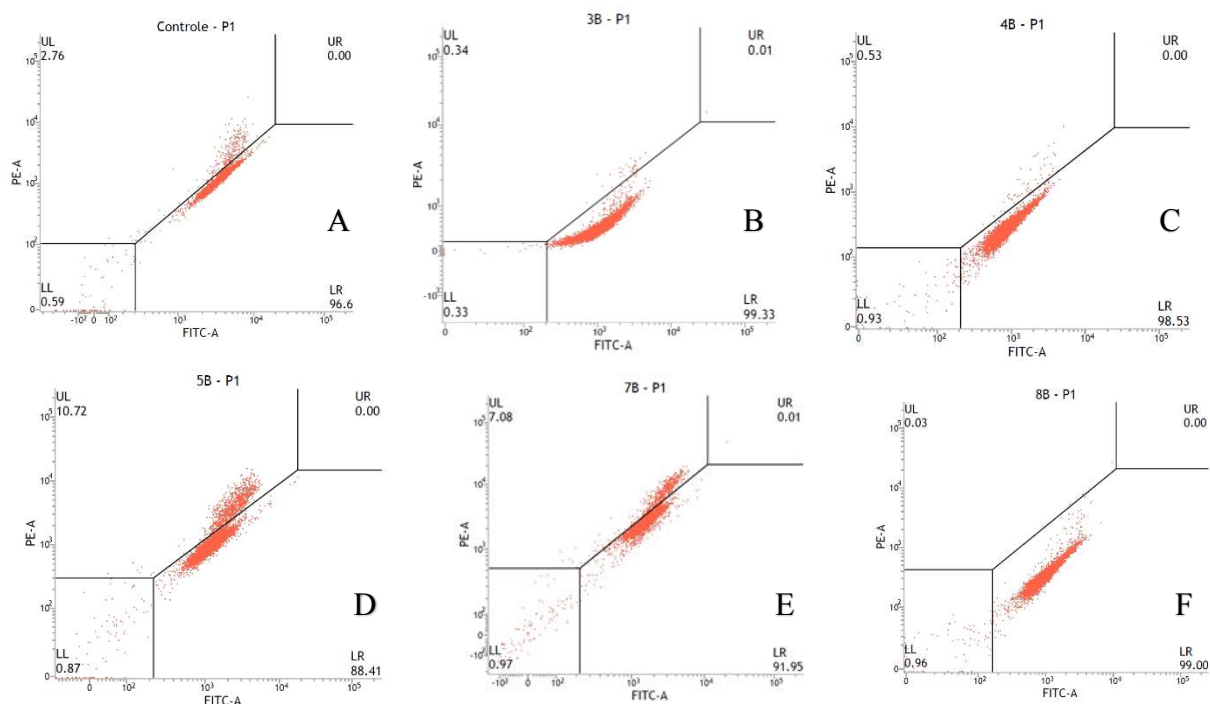


Figura 10. Avaliação da atividade mitocondrial através de citometria de fluxo na presença de diferentes concentrações de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e anticorpo 85B. **(A)** Controle negativo **(B)** 10^3 UFC/mL. **(C)** 10^4 UFC/mL. **(D)** 10^5 UFC/mL. **(E)** 10^7 UFC/mL. **(F)** 10^8 UFC/mL.

Todas as amostras, inclusive controle, apresentaram entre 85% a 99% de baixo potencial mitocondrial. No entanto, isto pode ter ocorrido devido a baixa motilidade que as amostras apresentavam no momento do descongelamento para a realização da citometria, sendo que há uma correlação positiva entre a motilidade total e $\Delta\psi$ (Paoli et al., 2011).

Vale ressaltar que durante o processo de congelação ocorrem vários danos às células espermáticas devido as baixas temperaturas a que são submetidas como formação de cristais de gelo intracelulares, aumento da concentração intracelular de solutos e outras modificações resultantes da desidratação celular. Danos celulares podem ser causados diretamente, afetando estruturalmente as organelas (ruptura de membranas), ou indiretamente, alterando as funções celulares através do processo metabólico (Holt, 2000). O que pode explicar o resultado obtido nesta análise do potencial mitocondrial pois o manuseio do material é delicado e há uma grande oscilação de temperatura para que ele seja realizado, mesmo sendo tomadas todas as precauções necessárias.

5.4. Interação de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* com células espermáticas

A figura 8 mostra o controle positivo das bactérias na microscopia eletrônica de varredura, na qual podemos observar os bacilos formando aglomeração característica das micobactérias (Thorel et al., 1990).

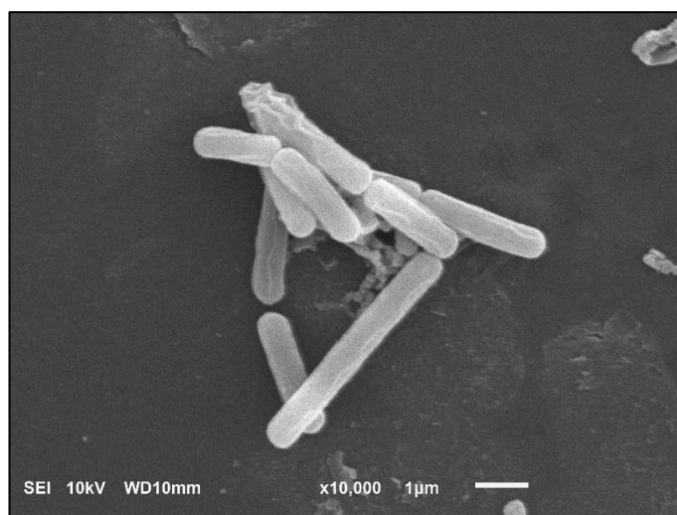


Figura 11. Aglomerado de bacilos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, controle positivo. Microscopia eletrônica de varredura. Magnitude 10.000 x.

Em estudo realizado anteriormente, Faria (2017) constatou que MAP adere-se preferencialmente a cauda do espermatozoide, peça intermediária, o que foi confirmado no presente estudo (Figura 9), em todos os três períodos pré-determinados de 1, 4 e 6 horas.

A ligação a fibronectina (FN), é um fator significativo na virulência de micobactérias, representando um potencial primeiro passo na ligação e entrada de micobactérias nas células hospedeiras (Kuo et al., 2011). A região da cauda do espermatozoide, possui em sua membrana plasmática a presença abundante de Fn (Pinke et al., 1997), o que pode explicar a predileção de MAP para esta localização.

A presença de patógenos aderidos ao espermatozoide afeta diretamente seu desempenho, como motilidade e vigor, o que pode estar relacionado com fenômenos desencadeados pela adesão ou devido a fatores solúveis liberados pelas bactérias (Yániz et al., 2010, Berktaş et al., 2008). No presente estudo, foi observado que a presença de MAP afeta os parâmetros de motilidade e vigor, ficando estes muito abaixo quando comparados ao controle negativo.

Fraczek et al., (2011) demonstrou através tanto de microscopia eletrônica de varredura, um contato direto de *E. coli*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Bacteroides ureolyticus* com espermatozoides, sendo fixados na superfície da cabeça do espermatozoide e do flagelo (peça intermediária e peça principal). Eles sugeriram que a adesão bacteriana e a aglutinação espermática, que apareceram na presença de *E. coli*, foram causadas por interações entre fímbrias e interações dependentes de receptores. Benchimol et al., (2008) constataram que *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* aderem tanto na cabeça e na cauda dos espermatozoides humanos e bovinos e são capazes de causar danos às células espermáticas, morte e aglutinação espermática.

A presença de bactérias no sêmen pode levar à imobilização espermática e a alterações nas membranas interna e externa do acrossomo, (Diemer et al ., 2000 ; Berktaş et al ., 2008), diminuição significativa de potencial mitocondrial e viabilidade, incapacitando muitas das vezes o espermatozoide a prosseguir para a fecundação (Schulz et al., 2010; Fraczek et al. 2011). A diminuição do potencial mitocondrial era esperado no presente estudo, pois o MAP adere-se fortemente a peça intermediária da célula espermática, no entanto não foi possível observar alterações no potencial mitocondrial, pois ao descongelarmos as palhetas para a realização da análise, os espermatozoides apresentavam baixa motilidade, refletindo assim em baixo potencial mitocondrial em todas as amostras testadas, sem diferenças entre elas.

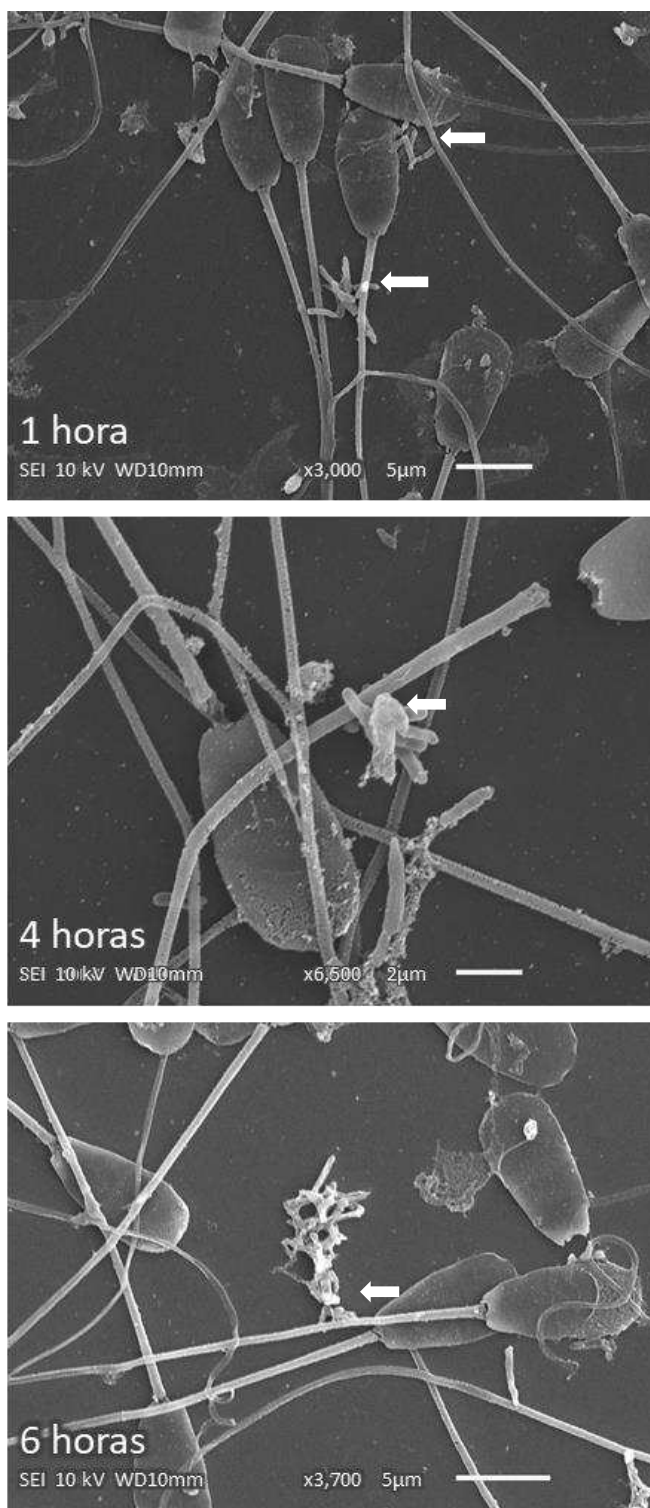


Figura 12. Interação de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e espermatozoides bovinos em 1, 4 e 6 horas (setas brancas). Microscopia de varredura. Diferentes magnitudes.

Quando observado a interação de MAP com a célula espermática na presença dos anticorpos 85A e 85B, notou-se a formação de fortes aglomerados de MAP, e não foram encontradas bactérias ligadas ao espermatozoide nos campos analisados (figuras 10 e 11).

Em estudo realizado por Abou-Zeid et al. (1988), ao produzirem anticorpos policlonais contra o complexo antígeno 85 de *M. bovis*, dos antígenos purificados 85A e 85B, conseguiram bloquear a adesão da bactéria às superfícies revestidas com Fn. O que pode ser constatado no presente estudo, onde não observou-se a adesão de MAP com as células espermáticas, nos campos analisados, quando os anticorpos 85A e 85B estavam presentes.

Kuo et al. (2011) caracterizaram as afinidades de ligação do antígeno 85 (85A, 85B e 85C) à Fn e demonstraram que as interações são diferentes entre eles, pois o mecanismo de interação entre as proteínas Ag85 e Fn depende da carga residual e das interações hidrofóbicas, havendo variação na sequência dos aminoácidos que as compõem, sendo o Ag85B com maior afinidade de ligação a Fn. Isto pode ser correlacionado com o encontrado no presente estudo, onde foi possível observar que espermatozoides na presença anticorpo 85B (Figuras 4, 6 e 7), mantinham a motilidade e vigor mais próximos do controle negativo, podendo inferir que houve um melhor bloqueio de interação de MAP.

O mecanismo mais simples pelo qual os anticorpos podem prevenir doenças é através da neutralização direta de um patógeno ou toxina. Anticorpos podem se ligar diretamente a patógenos e impedir sua entrada nas células, restringindo assim a replicação, disseminação, progressão de doenças impedindo as interações microbianas com os receptores da célula hospedeira (Lu et al., 2018).

Bannantine (2015), relatou forte formações de imunocomplexos devido a anticorpos monoclonais que se ligam seletivamente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Assim a formação de fortes aglutinados no presente estudo, podem estar correlacionados a formação de imunocomplexos entre o MAP e os anticorpos testados (Figuras 10 e 11), demonstrando uma afinidade entre antígeno e anticorpo.

Assim, é importante ressaltar que este trabalho é o ponto inicial para o entendimento de como ocorre a interação de MAP e células espermáticas, bem como os danos que pode acarretar a estas células e de como pode interferir nos parâmetros reprodutivos, tendo em vista que não há nada relacionado na literatura até o momento.

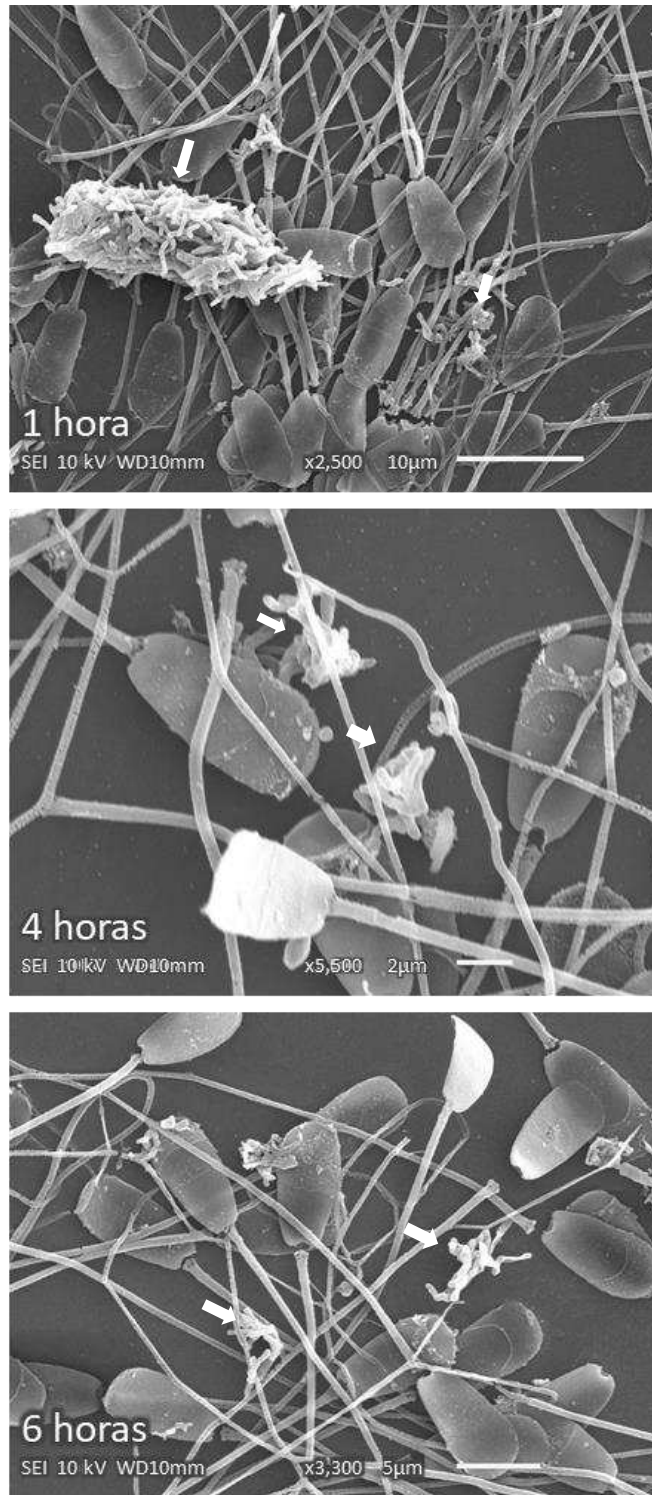


Figura 13. Interação de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* e espermatozoides bovinos em 1, 4 e 6 horas, na presença de anticorpo 85A. Observa-se a formação de fortes aglomerações da bactéria (setas brancas), mas estas não estão aderidas ao espermatozoide. Microscopia de varredura. Diferentes magnitudes.

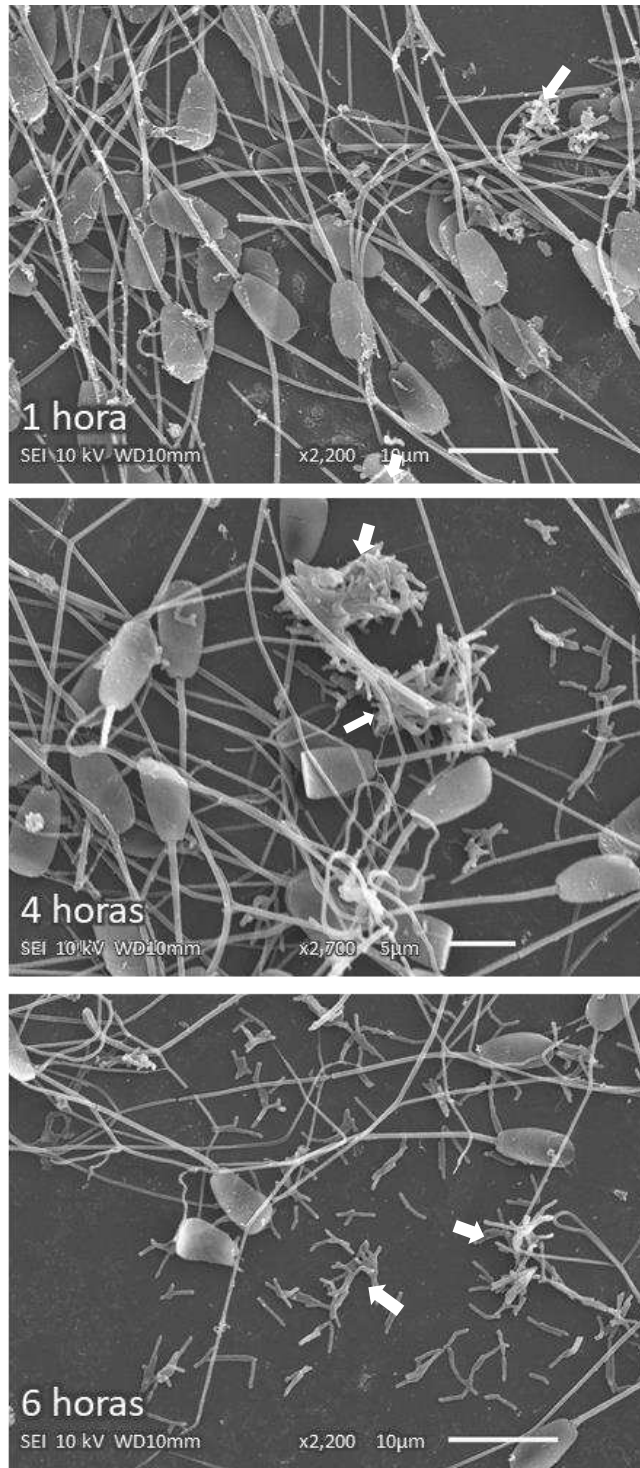


Figura 14. Interação de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* e espermatozoides bovinos em 1, 4 e 6 horas, na presença de anticorpo 85B. Observa-se a formação de fortes aglomerações e bactérias soltas (setas brancas) sem estarem aderidas ao espermatozoide. Microscopia de varredura. Diferentes magnitudes.

6. CONCLUSÃO

O sêmen bovino na presença de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* apresenta diminuição na motilidade e vigor proporcional a concentração de MAP, quanto maior a concentração de bactéria, menores parâmetros eram visualizados.

Foi possível determinar a viabilidade de MAP após a criopreservação apenas em concentrações maiores.

Proteínas de membrana de MAP, 85A e 85B, podem estar relacionados a interação/adesão com as células espermáticas, que ocorre na cauda do espermatozoide principalmente na peça intermediária.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho é o ponto inicial para explicação da interação de MAP e espermatozoides. Investigação de outros danos causados ao espermatozoide resultantes desta interação, são importantes para definir o grau de lesões e conseqüentemente a interferência na fertilização. Realização futuras de imunoenaios com marcação fluorescente, irão esclarecer o local exato aonde está ocorrendo a ligação antígeno-anticorpo trazendo maiores esclarecimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ZEID C., RATLIFF, T.L., WIKER, H.G., HARBOE, M., BENNEDSEN, J., ROOK, G.A. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. **Infect Immun.** 56(12):3046-51.

ALLEN, B.W. 1998. Mycobacteria: General culture methodology and safety considerations In: Tanya Parish and Neil G. Stoker (eds). *Mycobacteria Protoc. – Methods Mol. Biol.*, USA, p.101, 1-15.

ALTHOUSE, G.C., KUSTER, C.E., CLARK, S.G., WEISIGER, R.M. 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology.** 15;53(5):1167-76.

ARMITIGE, L.Y., JAGANNATH, C., WANGER, A.R., NORRIS, S.J. 2000. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages”, **Infect. Immun.** 68, 767–778.

ARRUDA, R., BARNABE, V., ALENCAR, M., BARNABE, R. 1992. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 29(1), 131-137. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.1992.51962>

AYELE, W.Y., BARTOS, M., SVASTOVA, P., PAVLIK, I. 2004. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. **Veterinary Microbiology** 103 (2004) 209–217.

BARRETT, D., M., GOOD, M., MORE, S. J. 2006. The economic impact of Johne’s disease in an Irish dairy herd: A case study. **Ir. Vet. J.** 59:301–305.

BARRETT, D. J., MEE, J. F., MULLOWNEY, P., GOOD, M., MCGRATH, G, CLEGG, T., MORE, S. J. 2011. Risk factors associated with Johne’s disease test status in dairy herds in Ireland. **Vet. Rec.** 168:410.

BANNANTINE, J. P. 2015. Hybridomas producing highly specific monoclonal antibodies to detect mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. **US pat.** 9,145.456 B1. 15p.

BEHR M.A., COLLINS D.M. 2010. Paratuberculosis: Organism, disease, control. **CAB international**, Cambridge. 375p.

BELISLE, J.T., VISSA, V.D., SIEVERT, T., TAKAYAMA, K., BRENNAN, P.J. AND BESRA, G.S. 1997. Role of the major antigen of Mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis. **Science** 276, 1420–1422.

BENCHIMOL, M., ROSA, I. A., FONTE, R. S., DIAS, A. J. B. 2008. Trichomonas adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. **Parasitology Research**. 102, 597–604.

BERKTAS, M., AYDIN, S., YILMAZ, Y., CECEN, K., BOZKURT, H. 2008 Sperm motility changes after coincubation with various uropathogenic microorganisms: an in vitro experimental study. **Int Urol Nephrol** 40: 383–389.

BRASIL. Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013. Torna obrigatória a notificação da suspeita ou ocorrência de doença listada no seu anexo.

BURAKOVA, Y., MADERA, R., MCVEY, S., SCHLUP, J. R., SHI, J. 2018. Adjuvants for Animal Vaccines. **Viral Immunology** Vol. 31, N° 1.

CASTRO, F.P.C., TRABULSI, L.R. 1999. Micobactérias e Nocardias. In: TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., CANDEIAS, J.A.N., GOMPERTZ, O.F(eds) **Microbiologia**. São Paulo, Editora Atheneu, p. 303 -314.

CBRA. (1998). Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2ª ed, Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 49 pp.

CHO, J., TAUER, L.W., SCHUKKEN, Y. H., SMITH, R. L., LU, Z., GROHN, Y. T. 2013. Cost-Effective Control Strategies for Johne's Disease in Dairy Herds. **Canadian Journal of Agricultural Economics** 61 (2013) 583–608

CHO, D., SHIN, S., TALAAT, A. M., COLLIN, M.T. 2007. Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. **Protein Expression and Purification**. 53 (2007) 411–420

CLARK, D. L., JR., KOZICZKOWSKI, J. J., RADCLIFF, R. P., CARLSON, R. A. ELLINGSON, J. L. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: Comparing fecal culture versus sérum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. **J. Dairy Sci.** 91:2620–2627.

COCITO, C., GILOT, P., COENE, M., DE KESEL, M., POUPART, P., VANNUFFEL, P. 1994. Paratuberculosis. **Clin. Microbiol.**, 7, 328-345.

CONNELL, M. O., McCLURE, N., LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction** v. 17, p. 704-709, 2002.

DHEENADHAYALAN, V., SHIN, K., CHANG, C., CHANG, C., WANG, S., MCDONOUGH, S., MCDONOUGH, P., STEHMAN, S., SHIN, S., TORRES, A. CHANG, Y. 2002. Cloning and Characterization of the Genes Coding for Antigen 85A, 85B and 85C of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **DNA Sequence**, 2002 Vol. 13 (5), pp. 287–294.

DIEMER, T., HUWE, P., MICHELMANN, H.W., MAYER, F., SCHIEFER, H.G., WEIDNER, W. 2000. *Escherichia coli*-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. **Int. J. Androl.** 23, 178–186.

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de valeur fécondante du sperme congelé. **Ann. Méd. Vet.**, v.4, p.215-24, 1967.

EAMENS, G.J., WALKER, D.M., PORTER, N.S., FELL, S.A., (2008). Radiometric pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in low-shedder cattle. **Australian Veterinary Journal**. 86, 259-265.

EPPLESTON, J., WHITTINGTON, R.J., 2001. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. **Aust. Vet. J.** 79, 776–777.

FARIA, A.C.S. 2017. Localização de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em amostras de sêmen bovino congelado. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FRACZEK, M, PIASECKA, M, GACZARZEWICZ, D, SZUMALA-KAKOL, A, KAZIENKO, A, LENART, S, LASZCZYNSKA, M, KURPISZ, M. (2011) Membrane stability and mitochondrial activity of humanejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Bacteroides ureolyticus*. **Andrologia**, 44, 315–329

GARCIA, A. B., SHALLOO, L. 2015. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. **J. Dairy Sci.** 98:1–21.

GHADIALI, A. H., STROTHER, M., NASER, S. A., MANNING, E. J., SREEVATSAN, S. 2004. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. **J. Clin. Microbiol.** 42:5345– 5348.

GONDA, M. G., Y. M. CHANG, G. E. SHOOK, M. T. COLLINS, AND B. W. KIRKPATRICK. 2007. Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. **Prev. Vet. Med.** 80:103–119.

GRANT, I. R.; HITCHINGS, E. I., MCCARTNEY, A.; FERGUSON, F. E.; ROWE, M. T. (2002). Effect of Commercial-Scale High-Temperature, Short-Time Pasteurization On The Viability Of *Mycobacterium Paratuberculosis* In Naturally Infected Cows' Milk. **Applied And Environmental Microbiology**, V.68, N.2, P.602-607

GUPTA, R.K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Adv Drug Deliv Rev** 1998; 32:155–172.

HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. 2004. Ciclos reprodutivos. **Reprodução Animal**. 7a edição. Barueri: Manole LTDA, 499 páginas. p: 55-68. 2004.

HERMON-TAYLOR, J. 2000. *Mycobacterium avium paratuberculosis* in the causation of Chron's Disease. **W. J. Gastroenterol.**, 6, 630-632.

HESS, J., GRODE, L., HELLWIG, J., CONRADT, P., GENTSCHEV, I., GOEBEL, W., LADEL, C., KAUFMAN, H.E. 2000. Protection against murine tuberculosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the 30-kDa antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 27 (2000) 283-289

HOGENESCH, H. 2002. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. **Vaccine**;20(Suppl 3):S34–S39.

HOLT, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22..

HORWITZ, M.A., LEE, B.W., DILLON, B.J., HARTH, G. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 92, 1530–1534.

HUYGEN, K.; VAN VOOREN, J.P., TURNEER, M., BOSMANS, R., DIERCKX, P., DE BRUYN, J. 1988. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. **Scand. J. Immunol.** 27, 187–194.

HUYGEN, K., CONTENT, J., DENIS, O., MONTGOMERY, D.L., YAWMAN, A.M., DECK, R.R., DEWITT, C.M., ORME, I.M., BALDWIN, S., D'SOUZA, C., DROWART, A., LOZES, E., VANDENBUSSCHE, P., VAN VOOREN, J.P., LIU, M.A., ULMER, J.B.

1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine”, **Nat. Med.** 2, 893–898.

JOHNE N. & FROTHINGHAM I. 1895. Ein eigentümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. **Dtsch. Z. Tiermed.** 21:438- 454.

KATAYAMA, S., ODA, K., OHGITANI, T. 1999. Influence of antigenic forms and adjuvants on the IgG subclass antibody response to Aujeszky’s disease virus in mice. **Vaccine**;17:2733–2739.

KENSIL, C.R. 1996. Saponins as vaccine adjuvants. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.** 13:1–55.

KHOL, J. L., KRALIK, P., SLANA, I., BERAN, V., AURICH, C., BAUMGARTNER, W., PAVLIK, I. 2010. Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. **J. Vet. Med. Sci.** 72(10): 1283–1288.

KHOSRO BEYGI A E ZARGHAMI N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. Prostaglandins Leukot **Essent Fatty Acids**, v.77, p.117, 2007.

KUO, C., BELL, H., HSIEH, C., PTAK, C.P., CHANG, Y. 2011. Novel Mycobacteria Antigen 85 Complex Binding Motif on Fibronectin. **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 287, N°. 3, pp. 1892–1902.

LARSEN, A.B., KOPECKY, K.E. 1970. Mycobacterium paratuberculosis in reproductive organs and semen of bulls. **Am. J. Vet. Res.** 31, 255–259.

LARSEN, A.B., STALHEIM, O.H.V., HUGHES, D.E., APPELL, L.H., RICHARDS, W.D., HIMES, E.M., 1981. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 179, 169–171.

LEID, J. G., HUNTER, D., SPEER, C. A., 2002. Early diagnosis of Johne's disease in the American bison by monoclonal antibodies directed against antigen 85. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 969:66–72.

LIU, H., NAISMITH, J.H. 2009. A simple and efficient expression and purification system using two newly constructed vectors. **Protein Expr Purif.** 63(2):102-11. doi: 10.1016/j.pep.2008.09.008.

LU L.L., SUSCOVICH, T.J. FORTUNE, S.M., ALTER, G. 2018. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. **Nat Rev Immunol.** 18(1):46-61. doi: 10.1038/nri.2017.106.

MARCIANI, D.J., KENSIL, C.R., BELTZ, G.A. 1991. Genetically engineered subunit vaccine against feline leukaemia virus: protective immune response in cats. **Vaccine**;9:89–96.

MERKAL, R.S., MILLER, J.M., HINTZ, A.M., BRYNER, J.H. 1981. Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. **Am. J. Vet. Res.**, 43, 676–678.

MEYERS, S.A. 2007. CHAPTER 43 – Advanced sêmen tests for stallions. **Current Therapy in Equine Reproduction.** p. 275-280.

MULLERAD, J., MICHAL, I., FISHMAN, Y., HOVAV, A. H., BARLETTA, R. G., BERCOVIER, H. 2002. The immunogenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* 85B antigen. **Med. Microbiol. Immunol.** 190:179–187.

NAGAI, S., WIKER, H. G., HARBOE, M., KINOMOTO, M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** 59, 372–382

NASER, S. A., GHOBRIAL, G., ROMERO, C., VALENTINE, J. F. 2004. Culture of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. **Lancet** 364:1039–1044.

NIELSEN S.S. & TOFT N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon γ assay and fecal culture techniques. **Vet. Microbiol.** 129:217-235.

OHARA, N., OHARA-WADA, N., KITaura, H., NISHIYAMA, T., MATSUMOTO, S., YAMADA, T. 1997. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.** 65:3680–3685.

OIE. 2008. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organization for Animal Health, Paris, France.

OLSEN, I., REITAN, L.J., HOLSTAD, G., WILKER, H.G. 2001. Alkyl Hydroperoxide Reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Infect. Immun.**, 68, 801-808, 2001.

ORTEGA-FERRUSOLA, C., GARCÍA, B.M., GALLARDO-BOLAÑOS, J.M. 2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.114, p.393-403.

PAOLI, D., GALLO, M., RIZZO, F., BALDI, E., FRANCAVILLA, S., LENZI, A., LOMBARDO, F., GANDINI, L. 2011. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. **Fertil Steril.** 95(7):2315-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.059.

PEÑA-MARTINEZ, A.I. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.209-224

PENG, Z., MA, T., PANG, D., SU, D., CHEN, F., CHEN, X., GUO, N., OUYANG, T., OUYANG, H., REN, L. 2016. Expression, purification and antibody preparation of PCV2 Rep and ORF3 proteins. **International Journal of Biological Macromolecules.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.073>

PINART, E., DOMÈNECH, E., BUSSALLEU, E., YESTE, M., BONET, S. 2016. A comparative study of the effects of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* upon boar semen preserved in liquid storage. **Anim. Reprod. Sci.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.007>.

PINKE, L. A., SWANLUND, D. J., HENSLEIGH, H. C., McARTHUR, J. B., ROBERTS, K. P., PRYOR, J. L. 1997. Analysis of Fibronectin on Human Sperm. **The Journal of Urology**. Vol. 158,936-941.

ROCHE, P.W., PEAKE, P.W., BILLMAN-JACOB, H., DORAN, T., BRITTON, W.J. 1994. T-cell determinants and antibody binding sites on the major mycobacterial secretory protein MPB59 of *Mycobacterium bovis*. **Infect. Immun.** 62, 5319–5326.

RONNING, D.R., KLABUNDE, T., BESRA, G.S., VISSA, V.D., BELISLE, J.T., SACCHETTINI, J.C. 2000. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. **Nat. Struct. Biol.** 7, 141–146.

ROSSEELS, V., MARCHE, S., ROUPIE, V., GOVAERTS, M., GODFROID, J., WALRAVENS, K., HUYGEN, K. 2006. Members of the 30- to 32-Kilodalton Mycolyl Transferase Family (Ag85) from Culture Filtrate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Are Immunodominant Th1-Type Antigens Recognized Early upon Infection in Mice and Cattle. **Infection and Immunity**, p. 202–212 Vol. 74, No. 1.

SANNAT, C., NAIR, A., SAHU, S.B., SAHASRABUDHE, S.A., KUMAR, A., GUPTA, A.K., SHENDE, R.K. 2015. Effect of species, breed, and age on bacterial load in bovine and bubaline semen. **Vet World** 8(4): 461-466.

SCHOREY, J.S., HOLSTI, M.A., RATLIFF, T.L., ALLEN, P.M., BROWN, E.J., 1996. Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. **Mol. Microbiol.** 21, 321–329.

SCHULZ, M., SÁNCHEZ, R., SOTO, L., RISOPATRÓN, J., VILLEGAS, J. 2010. Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. **Fertil. Steril.** 94, 619–623.

SILVA, P. F. N., GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SIQUEIRA, J. B., GUIMARÃES, J. D., COSTA, E. P., HENRY, M., TORRES, C. A. A., SILVA, M. V. G. B., SILVEIRA, T. S. 2007. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **R. Bras. Zootec.**, v.36, n.2, p.387-395.

SORGE, U. S., MOUNT, J., KELTON, D. F., GODKIN, A. 2010. Veterinarians' perspective on a voluntary Johne's disease prevention program in Ontario and western Canada. **Can. Vet. J.** 51:403–405.

THOREL, M. F, KRICHEVSKY, M, LÉVY-FRÉBAULT, V. V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, n.3, Jul, p.254-260.

ULANOVA M, TARKOWSKI A, HAHN-ZORIC M., 2000. The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide upregulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. **Infect Immun**; 69:1151–1159.

VELAZ-FAIRCLOTH, M., COBB, A.J., HORSTMAN, A.L., HENRY, S.C., FROTHINGHAM, R. 1999. Protection against *Mycobacterium avium* by DNA vaccines expressing mycobacterial antigens as fusion proteins with green fluorescent protein. **Infect Immun.** 67(8):4243-50

VIALE, M. N., ECHEVERRIA-VALENCIA, G., ROMASANTA, P., MON, M. L., FERNANDEZ, M., MALCHIODI, E., ROMANO, M. I., GIOFFRÉ, A. K., SANTANGELO, M.P. 2014. Description of a Novel Adhesin of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. **Biomed Res Int.**, 2014: 729618.

WHITLOCK, R. H., BUERGELT, C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 12:345–356.

WIERZBOWSKI, S., 1985. Bull semen opportunistic pathogen and ubiquitous microflora. In: **Disease Control in Semen and Embryos**, vol. 23. FAO, Rome, pp. 21–28.

WIKER, H.G., HARBOE, M. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*", **Microbiol. Rev.** 56, 648–661.

WHITTINGTON, R.J., MARSH, I.B., TAYLOR, P.J., MARSHALL, D.J., TARAGEL, C., REDDAKLIFF, L.A., (2003). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, 81, 559-563.

YAMASAKI, E. M.; BRITO, M. F.; MOTA, R. A.; MCINTOSH, D.; TOKARNIA, C. H. (2013). Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(2), 127-140.

YÁNIZ, J.L., MARCO-AGUADO, M. A., MATEOS, J. A., SANTOLARIA, P. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C . **Animal Reproduction Science**. 122 , pg 142–149. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.006

ZHU, D., TUO, W. 2015. QS-21: a potent vaccine adjuvant. **Nat Prod Chem Res**; 3:e113

9. ANEXOS

10/01/2016

CTNBio

Extrato de Parecer 4775/2015

Ano: 2015
Número: 4775
Tipo do Extrato: de Parecer
Data de Publicação no DOU: 22/10/2015
Número da Seção no DOU: 1
Página no DOU: 65

Texto: O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 186ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 08 de outubro de 2015, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo nº: 01200.002610/1997-04
Requerente: Universidade Federal de Viçosa-UFV
CQB: 024/97
Próton: 37687/15
Assunto: Solicitação de Parecer para Extensão de CQB / NB-1
Extrato Prévio: 4691/15 publicado em 13/07/15
Decisão: DEFERIDO

A Presidência da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio da instituição solicitou parecer técnico da CTNBio referente à extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB para incluir a área referente ao Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia (LIG) e Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIM), ambos de NB-1, para finalidade de pesquisa em regime de contenção e ensino. O responsável pela unidade operativa declara que as instalações contam com salas e equipamentos úteis em nível de biossegurança adequado às atividades propostas.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a CTNBio concluiu que o presente pedido atende às normas e legislação pertinentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exige a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

A íntegra deste Parecer Técnico consta do processo arquivado na CTNBio. Informações complementares ou solicitações de maiores informações sobre o processo acima listado deverão ser encaminhadas por escrito à Secretaria Executiva da CTNBio.

DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI
Presidente da CTNBio

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 78/2017, intitulado “**Análise espermática bovina na presença e ausência de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis**”, coordenado pela professora Maria A. Scatamburlo Moreira do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 04/12/2017, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 78/2017, named “**Bovine sperm analysis in the presence and absence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis**”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 04, 2017 valid for 12 months.



Prof.^a Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV