

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E  
PRODUÇÃO DE RUMINANTES**

MICHEL RODRIGUES BARAN

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM  
AMOSTRAS DE SÊMEN PROVENIENTES DE TOUROS JOVENS**

---

Londrina / PR  
Dezembro/ 2014

MICHEL RODRIGUES BARAN

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM  
AMOSTRAS DE SÊMEN PROVENIENTES DE TOUROS JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção de Ruminantes da Universidade Norte do Paraná e Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina  
2014

MICHEL RODRIGUES BARAN

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1  
EM AMOSTRAS DE SÊMEN PROVENIENTES DE TOUROS  
JOVENS**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luiz Cesar da Silva  
Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Michele Lunardi  
Universidade de Cuiabá - UNIC

Londrina, 10 de outubro de 2014.

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe Rosa Maria Rodrigues Baran*

*Ao meu Pai, Ailton Eliseu Baran*

*Aos meus Filhos, Nathan e Anthony*

*À minha esposa Fram*

*Aos meus irmãos Iuri, Karin e Tamy*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** pela vida, pela **saúde** e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus pais por todo seu amor, carinho, apoio e esforços dedicados à minha formação. Obrigado por serem maravilhosos.

A Minha Esposa Fram, sei que acredita em mim.

Aos Meus Filhos que tanto amo, pelo sorriso. Pois não sabem como sorrisos derrubam muralhas e levantam pessoas.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Amauri Alcindo Alfieri e Co-orientador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Selwyn Arlington Headley pelas orientações, pela oportunidade e por confiarem no meu trabalho no mestrado.

Aos membros da banca de qualificação Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Luiz Cesar da Silva e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes Alfieri por aceitarem o convite e pelas importantes considerações.

Aos membros da banca de defesa pela disponibilidade e por aceitarem o convite

A todo corpo docente do programa de pós-graduação da UNOPAR e UEL pela formação científica.

Ao Coordenador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Werner Okano pelo inegável apoio não só no programa de pós-graduação, mas também em todas as dificuldades da profissão.

Ao Wagner Borges por toda ajuda nas análises em laboratório, pelos ensinamentos, pelos esclarecimentos das dúvidas constantes por sempre se preocupar com meu trabalho. Obrigado pela atenção, amizade e compreensão.

Ao Nutritional Agropecuária, através do prof. Celso Koetz Junior pela cessão do material.

A Todos do laboratório Virologia Animal-UEL, pela parceria no mestrado pela amizade. Obrigado!

A Todos os companheiros de Turma, em especial ao amigo Juarez Cesar Borges de Aquino (*in memoriam*)! Meu muito Obrigado!

*“O segredo de qualquer conquista é a coisa mais simples do mundo:  
-Difícil é saber o que fazer com ela.”*

Desconhecido.

BARAN, M.R. **Avaliação da presença de herpesvírus bovino tipo 1 em amostras de sêmen provenientes de touros jovens.** p. 50, 2014. Dissertação (Mestrado em saúde e produção de ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Araçongas e Universidade Estadual de Londrina, Londrina

## RESUMO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um importante patógeno do trato reprodutivo bovino que está amplamente disseminado em rebanhos de corte e leite em todas as regiões geográficas brasileiras. Touros soropositivos podem eliminar o vírus de forma intermitente pelo sêmen e, com isso, constituem em importantes veiculadores desta infecção viral para as fêmeas. Estudos mostram que touros adultos apresentam altas taxas de infecção e de eliminação do vírus no sêmen. O presente estudo foi delineado com o objetivo de avaliar a presença de BoHV-1 em amostras de sêmen provenientes de touros jovens assintomáticos em um rebanho regularmente vacinado contra o BoHV-1. Na primeira avaliação, realizada utilizando apenas touros jovens, ainda não incorporados ao sistema de reprodução, rebanho avaliado, são de touros da raça Braford, provenientes de dois duas localidades, sendo grupo 1 (G1) do estado do Paraná (n=12) e grupo 2 (G2) do estado do Rio Grande do Sul (n=37). Para a segunda avaliação, realizada um ano após, e antes da utilização dos touros em uma segunda estação de monta, foi possível coletar sêmen de 15 touros, todos avaliados na primeira avaliação, sendo cinco do G1 e 10 do G2. Todas as amostras permaneceram estocadas a -80°C até a realização dos testes. A presença do BoHV-1 nas amostras de sêmen foi avaliada por meio da amplificação de um produto com 468 pares de base do gene da gD do BoHV-1, por meio da técnica de semi nested-PCR. Nas 49 amostras de sêmen provenientes da primeira coleta o DNA do BoHV-1 foi identificado em cinco amostras(10,2%). Nos animais da segunda coleta, 15 amostras, o DNA do BoHV-1 foi amplificado em duas (13,33%) amostras, as quais haviam resultado negativo em primeira etapa. Alguns dos animais considerados positivos em primeira etapa foram reavaliados em segunda etapa, os quais foram negativos, com intervalo de um ano entre etapas. A especificidade dos produtos amplificados pela reação de semi-nestedPCR foi confirmada por meio da reação de sequenciamento e análise dos amplicons obtidos nesse estudo, que apresentaram 100% de identidade com o gene da GD do BoHV-1. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a frequência de sêmen positivo para o BoHV-1 proveniente de touros jovens e regularmente vacinados para o BoHV-1, na dependência do rebanho avaliado, pode ser baixa. Com isso, o uso dessa categoria animal em sistema de reprodução com IATF e repasse com touros, em rebanhos com vacinação regular e sistemática contra a infecção com o BoHV-1 no período pré-estação de monta, pode contribuir com a redução da circulação viral e, conseqüentemente, com a redução na taxa de excreção viral pelo sêmen.

**Palavras-chave:** Bovinos, reprodução, BoHV-1, excreção viral, diagnóstico, sêmen.

BARAN, MR Evaluation of the presence of bovine herpesvirus 1 in semen samples from young bulls. p. 50, 2014 Thesis (MS in health and ruminant production) - University of North Parana, Arapongas and State University of Londrina, Londrina

## ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) is an important pathogen of bovine reproductive tract that is widespread in beef herds and milk in all geographical regions. Seropositive bulls can eliminate the virus intermittently for semen and thereby constitute important backers of this viral infection for females. Studies show that adult bulls have high rates of infection and elimination of virus in semen. This study was designed to evaluate the presence of BoHV-1 in semen samples from asymptomatic young bulls in a herd regularly vaccinated against BoHV-1. In the first evaluation, carried out using only young bulls, not yet incorporated into the reproductive system, rated herd, are bulls Braford from two two locations, with group 1 (G1) of the state of Paraná (n = 12) and group 2 (G2) of the state of Rio Grande do Sul (n = 37). For the second evaluation, conducted one year after, and before the use of bulls in a second breeding season, it was possible to collect semen from 15 bulls, all evaluated in the first evaluation, five of G1 and G2 10. All specimens were stored at -80 ° C until testing. The presence of bovine herpesvirus type 1 in semen samples was assessed by amplification of a product with 468 base pairs of the bovine herpesvirus type 1 gD gene, through the semi-nested PCR. In the 49 semen samples from the first collection BoHV-1 DNA was identified in five samples (10.2%). In the animals of the second test, 15 samples, bovine herpesvirus type 1 DNA was amplified in two (13.33%) samples, which were negative in the first step. Some of the animals considered positive in the first stage were assessed in the second stage, which were negative at an interval of one year between steps. The specificity of amplified products by semi-nestedPCR reaction was confirmed by means of sequencing reaction and analysis of the amplicons obtained in this study, which showed 100% identity with the GD gene of bovine herpesvirus type 1. The results of this study showed that the frequency of positive semen to BoHV-1 from young bulls and regularly vaccinated for BoHV-1, depending on the estimated herd may be low. Thus, the use of the experimental animals in breeding system with TAI and pass with bulls in herds with regular and systematic vaccination against infection with BoHV-1 in pre-breeding season period, can contribute to the reduction of viral circulation and hence the reduction in viral excretion rate by semen.

**Keywords:** Cattle, reproduction, BoHV-1, virus shedding, diagnosis, semen.



## LISTA DE TABELAS

### 5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

<b>Tabela 1</b>	Detecção do gene gD de BoHV-1 por meio da técnica de <i>semi-nested</i> -PCR realizada em amostras de sêmen de touros jovens, distribuídas de acordo com o período de colheita e região de origem dos rebanhos avaliados	<b>34</b>
-----------------	--	-----------

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
<b>2.1 HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1</b>	<b>16</b>
<b>3. REFERÊNCIAS</b>	<b>20</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL</b>	<b>25</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>25</b>
<b>5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b>	<b>26</b>
<b>AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM AMOSTRAS DE SÊMEN     PROVENIENTES DE TOUROS JOVENS</b>	<b>26</b>
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b>	<b>28</b>
<b>5.2 MATERIAL e MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>5.3 RESULTADOS e DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>5.4 REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>43</b>
<b>7. APÊNDICES</b>	<b>45</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina brasileira é constituída por, aproximadamente, 211 milhões de animais e representa o maior rebanho bovino comercial do mundo (IBGE, 2013). Deste contingente, cerca de 74,5 milhões de animais são fêmeas aptas para a reprodução (>2 anos) e em apenas, aproximadamente, 10% destas fêmeas é empregada a biotécnica da inseminação artificial (IA) (ANUALPEC e ASBIA, 2012). Com isto, a reprodução por monta natural predomina nos rebanhos bovinos brasileiros, com maior destaque nos rebanhos de corte. Neste contexto, o perfil sanitário tanto de vacas quanto de touros é fundamental para a obtenção de bons índices reprodutivos.

A viabilidade da produção pecuária está diretamente relacionada às taxas de sucesso obtidas em alguns parâmetros utilizados para aferir a eficiência reprodutiva de rebanhos bovinos (FEUZ e UMBERGER, 2003). Um dos parâmetros que mais interfere com a produção pecuária é o intervalo entre partos que, quando em períodos inadequados, contribui diretamente com a redução da lucratividade da atividade. As causas do aumento do intervalo entre partos podem ser complexas e multifatoriais, porém, nos rebanhos bovinos brasileiros destaca-se como principais etiologias deste distúrbio reprodutivo tanto as deficiências nutricionais quanto as doenças infecciosas (KIRKBRIDE, 1985; TAKIUCHI *et al.*, 2005).

As doenças infecciosas do trato reprodutivo bovino podem ser originadas por várias classes de microorganismos como bactérias, protozoários e vírus que podem comprometer tanto animais machos quanto fêmeas. Na dependência do agente etiológico, os touros infectados podem carrear o potencial patógeno pelo sêmen. O sêmen de animais infectados pode estar contaminado com o agente etiológico apenas no período agudo da infecção, em algumas ocasiões, os touros podem tornar-se

cronicamente infectados. Na dependência do microrganismo, o sêmen pode estar contaminado com o patógeno nas formas ocasionais, frequente ou, intermitente (DAVIES e DUCAN, 1974; ACKERMANN e WYLER, 1984; ANGELENBURG *et al.*, 1993). Dentre os principais agentes infecciosos que podem ser transmitidos pelo sêmen bovino destacam-se *Campylobacter fetus*, *Mycoplasma sp.*, *Brucella abortus*, *Leptospira spp.*, *Neospora caninum*, herpesvírus bovino Tipo 1 (*bovine herpesvirus 1*-BoHV-1) e o Vírus da Diarreia Viral bovina (*bovine viral diarrhea virus* - BVDV). A infecção por esses microorganismos podem ser responsáveis por reduções consideráveis nas taxas de ovulação, fertilização e de sobrevivência embrionária, fetal e perinatal (NASCIMENTO e SANTOS, 2003; LOTTHAMMER, 1988; YEAGER *et al.*, 1998; RESENDE *et al.*, 2001).

Especificamente com relação ao BoHV-1, vários estudos sorológicos realizados tanto em rebanhos bovinos leiteiros quanto de corte em praticamente todas as regiões geográficas demonstram a ampla disseminação da infecção nos rebanhos brasileiros (MÉDICI *et al.*, 2000; TAKIUCHI *et al.*, 2001). A principal característica biológica e que apresenta impacto direto na epidemiologia das infecções pelo BoHV-1 é que a infecção primária é seguida de latência viral que torna os animais infectados portadores assintomáticos do vírus por toda a sua vida e potenciais transmissores (ACKERMANN e WYLER, 1984). A saída do estado de latência é acompanhada de reexcreção viral. Em touros, o BoHV-1 pode ser eliminado de forma intermitente pelo sêmen (ENGELENBURG *et al.*, 1993; ENGELS e ALCKERMANN, 1996).

O BoHV-1 é considerado o patógeno viral de maior importância sanitária encontrado no sêmen bovino e a infecção pode resultar em sinais clínicos tanto nos touros quanto nas vacas. As múltiplas formas de manifestação clínica estão associadas ao trato respiratório (rinotraqueíte), genital (vulvovaginite, balanopostite), neurológico

(encefalite) e ocular (conjuntivite). A infecção do trato reprodutivo da fêmea bovina pode ser seguida de mortalidade embrionária (precoce ou tardia), fetal ou ainda perinatal (KARHS, 1977; MUELLER *et al.*, 1979; ELAZHARY *et al.*, 1980; WYLER, *et al.*, 1989; ROIZMANN *et al.*, 1992; ; DEKA, 2005).

Considerando a importância da monta natural no sistema de reprodução do rebanho bovino brasileiro; a excreção do BoHV-1 de forma intermitente no sêmen de touros naturalmente infectados; e a alta taxa de infecção pelo BoHV-1 observada nos vários estudos soro epidemiológicos realizados em rebanhos bovinos de corte e leite de praticamente todas as regiões geográficas brasileiras, demonstra que o sêmen pode ser uma forma eficaz de transmissão do BoHV-1 e que a sua presença deve ser regularmente monitorada em lotes de touros empregados na reprodução de bovinos em sistema de monta natural.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1

Em medicina veterinária, os herpesvírus são responsáveis por infecções que causam importantes doenças com impacto tanto em animais de produção quanto de estimação. Em bovinos, as infecções pelo BoHV-1 podem ser responsáveis por quadros clínicos que causam consideráveis prejuízos econômicos à exploração pecuária de corte e leite (KIRKBRIDE, 1985).

O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellorirus*. O vírion, com 180–200nm de diâmetro, é composto por um nucleocapsídeo icosaédrico de cerca de 125-130nm de diâmetro, que envolve o genoma. Particularmente nesta família, o nucleocapsídeo está envolto por uma camada proteica amorfa, o tegumento (ARMSTRONG *et al.*, 1961;. TIKKOO *et al.*, 1995; JONES 1998). O genoma viral, constituído por DNA fita dupla linear com extensão de aproximadamente de 137-139kpb (FIELDS e KNIPE,1992; ROIZMAN *et al.*, 2001), apresenta um elevado teor de guanina e citosina (GC) dispostos como um genoma de classe D herpesvírus (PLUMMER *et al.*, 1969; MUYLKENS *et al.*, 2007).

Uma das principais características biológicas dos *Alphaherpesvírus* é sua capacidade de estabelecer latência no hospedeiro. A infecção inicia-se nas mucosas oral, nasal, superfície ocular ou mucosa genital e os neurônios constituintes de nervos sensoriais são é os principais locais de latência viral, particularmente o gânglio do nervo trigêmeo (JONES *et al.*, 2010). Entretanto, evidências sugerem que o estado de latência pode também ocorrer em outros locais não neuronais, como folículos linfóides e tonsilas palatinas, quando infecção por mucosa genital, gânglios paralombares (WINKLER *et*



*al.*, 2000), células do sangue periférico (FUCHS *et al.*, 1999), gânglios linfáticos e baço (MWEENE *et al.*, 1996). Após a infecção primária da mucosa genital, o vírus também pode estar na forma latente nos gânglios parolombares (ACKERMANN e WYLER, 1984; ENGELENBURG *et al.*, 1995).

Fatores que causam imunodepressão, como estresse ou terapia com corticosteróides, são considerados fatores predisponentes para a redução da vigilância do sistema imunológico. Com isto, nas situações de reativação da infecção, o vírus pode ter sucesso na replicação e formação de progênie viral facilitando, desta forma, a transmissão para outros animais susceptíveis (ENGELENBURG *et al.*, 1995).

Mesmo em animais assintomáticos, nos quais a reativação do BoHV-1 está ocorrendo, podem apresentar excreção de vírus no sêmen e demais secreções, observada em infecções brandas ou subclínicas (SNOWDON, 1965; ENGELENBURG *et al.*, 1995).

Os animais latentemente infectados com o BoHV-1 são considerados o principal elo da cadeia epidemiológica das herpesviroses, uma vez que são os responsáveis pela manutenção do vírus no rebanho. Touros soropositivos podem eliminar de forma intermitente o vírus pelo sêmen podendo contaminar tanto a vaca quanto o concepto (MARSI *et al.*, 1996).

A transmissão do BoHV-1 ocorre, principalmente, por contato direto, por aerossóis em curtas distâncias ou até mesmo de forma indireta. Após a replicação viral nas células epiteliais da mucosa do trato respiratório superior, o BoHV-1 é excretado em alta concentração pelo secreção nasal. O período de excreção viral pode variar de 10 a 16 dias (MURPHY *et al.*, 1999).

As principais vias de eliminação do vírus são secreções respiratórias, oculares, genitais e sêmen. A transmissão horizontal é a mais importante e ocorre por meio do contato direto, particularmente mucosa (cópula, lambedura entre mãe e filho e de animais em estro), aerossóis ou indiretamente por meio de fômites. A transmissão vertical pode ocorrer em qualquer estágio da gestação (PITUCO, 1999).

O BoHV-1 no sêmen é um dos principais agentes de redução da eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos no Brasil e no mundo. Na fêmea, a infecção com sêmen contaminado pode ocasionar endometrite, apresentam taxa de não retorno ao serviço de apenas 13,4% comparada com a taxa de 60,8% observada no lote de vacas que receberam sêmen livre de contaminação (MEYER, *et al.*, 2003).

Tem sido postulado que o BoHV-1, pode replicar predominantemente na mucosa prepucial e na uretra pode contaminar o sêmen durante a ejaculação, quando o líquido seminal passa sobre as mucosas infectadas. Esta afirmação foi confirmada por Engelenburg (1993) que encontrou mais de 90% do DNA do BoHV-1 no fluido seminal, praticamente não havendo detecção do vírus junto aos espermatozóides.

Considerando as diversas formas clínicas observadas em animais infectados, a infecção pelo BoHV-1 pode ser considerada uma síndrome. As formas clínicas mais frequentes são a reprodutiva, respiratória, genital, conjuntival e sistêmica (ROIZMANN *et al.*, 1992). Considerando que o presente estudo tem como foco a avaliação da presença do BoHV-1 no sêmen bovino, a presente revisão abordará exclusivamente as formas genital e reprodutiva da infecção.

A forma genital na fêmea, denominada vulvovaginite pustular infecciosa, tem como sinais clínicos característicos: inflamação e presença de nódulos avermelhados na mucosa vulvar, podendo evoluir para vesículas, erosões e úlceras; micção freqüente; cauda elevada; prolapso uterino; relutância no coito; e, até mesmo, infertilidade

temporária nos casos de infecção uterina direta (GIBBS; RWEYEMANN, 1977; WYLER *et al.*, 1989).

A forma genital no macho, denominada balanopostite pustular infecciosa, é caracterizada pela presença de pequenos nódulos avermelhados na mucosa do prepúcio e do pênis, que podem evoluir para pústulas. O pênis torna-se avermelhado e dolorido, podendo ocorrer micção frequente e incapacidade para a monta (WYLER *et al.*, 1989).

Em rebanhos bovinos soronegativos, a infecção com o BoHV-1 pode ocasionar consequências diretas na esfera reprodutiva onde podem ser observados diferentes sinais clínicos. Na dependência do estágio gestacional, essas infecções podem determinar mortalidades embrionárias, fetais ou neonatais, que se refletem como repetição de cio a intervalos regulares ou irregulares, abortamentos, natimortalidades e o nascimento de animais debilitados, com peso corporal abaixo da média da raça, podendo ser confundida com outras doenças infecciosas como Leptospirose e Diarréia Viral Bovina, dentre outras (ELLIS *et al.*, 1982; MCGOWAN; KIRKLAND, 1995; RUDAN *et al.*, 1999; TAKIUCHI *et al.*, 2005).

O BoHV-1 já foi relatado em sêmen bovino proveniente de touros de várias regiões do Brasil e do mundo. Rana (2011) utilizando como diagnóstico a técnica de PCR, detectou BoHV-1 em 152 amostras de sêmen congelados de bovinos e de búfalos em centrais de colheita de sêmen da Índia. Oliveira (2011), também demonstrou por PCR a presença de BoHV-1 em 44,7% (34/76) e BoHV-5 em 100% das amostras (76/76) avaliadas, sendo 53 amostras de sêmen frescos e 23 amostras de sêmen congelados de bovinos da raça Nelore, com 2 a 3 anos e Angus e Hereford, com 3 a 7 anos, provenientes dos estados do Rio Grande do Sul e Goiás. Diallo (2010) também

detectou o BoHV-5 em sêmen bovino na Austrália, em análises de rotina, diferenciando-o de BoHV-1 por meio de PCR.

A PCR revelou-se uma alternativa viável, rápida, sensível e específica para aplicação na rotina de diagnóstico da infecção pelo BoHV-1, obtendo bons resultados para o monitoramento sanitário do sêmen infectado naturalmente e artificialmente (XIA *et al.*, 1995, MARSI *et al.*, 1996; MEYER *et al.*, 2003; TAKIUCHI *et al.*, 2003).

Considerando, vários aspectos como a alta frequência nas amostras de sêmen bovino, positivas para o BoHV-1 na maioria dos estudos realizados; a importância deste patógeno viral para o trato reprodutivo da fêmea bovina; os seus efeitos negativos nos parâmetros utilizados para avaliar, a eficiência reprodutiva de vacas de rebanhos de corte comercial em regime de estação de monta natural, e até mesmo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com repasse com touro; a alta frequência da infecção pelo BoHV-1 identificada nos rebanhos bovinos brasileiros; a falta de informações relativas à presença do BoHV-1, em amostras de sêmen de touros jovens que ainda não entraram em reprodução, e a importância da avaliação e adoção de medidas de controle e profilaxia para esta virose. O presente estudo teve como objetivo avaliar a taxa de excreção viral em amostras de sêmen *in natura* obtidas de touros jovens, ainda não utilizados para reprodução por monta natural por meio da técnica de Semi nested PCR.

### 3. REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. ; WYLER, R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Veterinary Microbiology**, v.9, p.53-63, 1984.
- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA. **ANUALPEC 2012**. São Paulo: Informa Economics FNP, 2012. 378 p.
- ARMSTRONG, J.A.; PEREIRA, H.G. e ANDREWES, C.H. Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis, and its affinity with the herpesvirus group. **Virology**, v.14, p.276-285, 1961.
- ASBIA- Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen 2012**. Disponível em: <<http://www.cigeneticabovina.com.br/>> acesso em: 19 ago 2014.
- DAVIES, D.H; DUNCAN, J.R. The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids. **Cornell Veterinary**, v.64, p.340-66, 1974.
- DEKA, D.; RAMNEEK, MAITI, N.K. e OBERI, M.S. Detection of bovine herpesvírus -1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. **Rev. science Technology off. Int. Epizooty**, v.24, n.3, p.1085-1094, 2005.
- DIALLO, I.S et al. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Australian Veterinary** , v.88, p.93-5, 2010.
- ELAZHARY, M.A.S.Y.; LAMOTHE, P.; SILIM, A., Bovine Herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. **Canadian Veterinary Journal** , v.21, n.12, p.336-339, 1980.
- ELLIS, W. A. et al. Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. **Veterinary Record**, v.110, p.178-180, 1982.
- ENGELBURG, F.A. et al. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**. v.31, p.3129-35, 1993.
- ENGELBURG, F.A.C. et al. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. **Journal of clinical Microbiology**, v.33, n.2, p.308-312, 1995.
- ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**. v.53, p.3-15, 1996.
- FEUZ, D.M.; UMBERGER, W.J. Beef cow-calf production. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**, v.19, p.339-363, 2003.

- FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Virology**. New York: *Raven Press*, 1992. v.2, p.2419
- FUCHS, M. et al. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 2498-2507, 1999.
- GIBBS, E.P.; RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine Herpesvirus 1, **Veterinary Bulletin**. v.47, p.317-343, 1977.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/>> acesso em: 15 set 2014.
- JONES, C. Alpha herpesvirus latency: Its role in disease and survival of the virus in nature. **Adv Virus Res.**, v.51, p.81-133, 1998.
- JONES, C.J.; CHOWDHURY, S. Bovine herpesvirus type 1 (bvh-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. **Veterinary Clinical North Am Food Animal Practice**, v.26, n.2, p.303-321, 2010.
- KAHRS, R.F. Infectious Bovine Rhinotracheitis: A review and update. **Journal Am. Veterinary Méd. Association.**, v.171, n.10, p.1055- 1064, 1977.
- KENDRICK, J.W.; McENTEE, K. The effects of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. **Cornell Veterinarian**, v. 57, n.1, p.3-11, 1967.
- KIRKBRIDE, C.A.. Managing and outbreak of livestock abortion. 2.Diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, v.80, n.5, p.70-79, 1985.
- LOTTHAMMER, K. H. Transtornos de la fertilidad de origen ambiental. In: GRUNERT, E.; BERCHTOLD, M. **Infertilidad en la vaca**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1988. p.375-385
- MARSI, S.A.; OLSON, W.; NGUYEN, P.T.; *et al.* Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.60, p.100-107, 1996.
- McGOWAN, M.R; KIRKLAND, P.D. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. **British Veterinary Journal**, v.151, p.263-270, 1995.
- MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v.30 n.2, p.347-350, 2000.
- MEYER, A.D. *et al.* Comparação das técnicas de isolamento viral e nested PCR na detecção do BoHV-1 em sêmen bovino experimentalmente e naturalmente contaminado. **Arquivo Instituto Biológico de São Paulo**, v.70, n.2, p.123-126, 2003.
- MURPHY, F.A. et al. Herpesviridae. In: **Veterinary virology**. 3 ed. San Diego : Academic, , 1999. p.301-325
- MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research** , v.38, n.2, p.181-209, 2007.

MWEENE, A. S.; OKAZAKI, K. ; KIDA, H. Detection of viral genome in nonneural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. **Journal Veterinary Research**, v.44, n.3, p.165-174, 1996.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

OLIVEIRA, M.T. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v.75, p. 1139-1145, 2011.

PITUCO, E.M. et al. Detecção de anticorpos em bovinos contra o Herpesvírus Bovino 1 (HVB-1) em rebanhos de corte e leite com problemas reprodutivos no Brasil. **Arquivo Instituto Biológico** v. 66, p. 1-171, 1999.

PLUMMER, G. et al. Comparative study of the DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. **Virology**. v.39, n.1, p.134-137, 1969.

RANA, S. K. Et al. . Use of real time polymerase chain reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo sêmen in Índia. **Veterinary Italian**, v.47, n.3, p.313-22, 2011.

RESENDE, O.A. Problemas não-infecciosos que afetam a reprodução de bovinos: visão do veterinário de campo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.96-101, 2001.

ROIZMAN, B ; KNIPE, D. M. **Herpes simplex viruses and their replication: Fields virology**. New York: Williams & Wilkin, 2001. v.2, p.2399-2459

ROIZMANN, B. et al. .The family herpesviridae: An update. The herpesvirus study group of the international committee on taxonomy of viruses. **Archive Virology**, v.123, n.3-4, p. 425-449, 1992.

RUDAN, N. B. et al. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology**, v.51, n.5, p.875-881, 1999.

SNOWDON, W.A. The IBR/IPV virus-reaction to infection and intermittent recovery of the virus from experimentally inoculated cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.41, n.5, p.135-142, 1965.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.203-209, 2001.

TAKIUCHI, E. et al. . Otimização da reação em cadeia pela polimerase (Semi Nested-PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p.43-56, 2003.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. et al. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Res. Veterinary Science**, v.79, p.85-88, 2005.

TIKKOO, S. K.; CAMPOS, M. e BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus 1 (bvh-1): Biology, pathogenesis and control. **Virus Res.**, v.45, p. 191-223, 1995.

YEAGER, M.J.et al. The effect of subclinical selenium toxicosis on pregnant beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p.268-273, 1998.

WHITE, M.B., SNOWDON, W.A. The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, n. 11, p. 501-506, 1973.

WINKLER M.T.; DOSTER A.; JONES C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **Journal Virology**, v. 74, p.5337–5346, 2000.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs**. Boston: *Kluwer Academic Publishers*, 1989. p.1-72

XIA, J.Q.; YASON, C.V.; KIBENGE, F.S.B. Comparison of dot blot hybridization, PCR, and virus isolation for detection of BHV-1 in artificially infected bovine semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.59, n.2, p.102-109, 1995.



## **4. OBJETIVOS**

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o perfil sanitário e frequência para o BoHV-1 em amostras de sêmen provenientes de touros jovens, ainda não inseridos em trabalho de reprodução por monta natural.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Amplificar o DNA do BoHV-1 a partir do sêmen de animais assintomáticos por meio da técnica Semi nested-PCR;
- Avaliar a frequência de eliminação do BoHV-1 em amostras de sêmen.

## **5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

### **AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM AMOSTRAS DE SÊMEN PROVENIENTES DE TOUROS JOVENS**

## AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE HERPESVÍRUS BOVINO 1 EM AMOSTRAS DE SÊMEN PROVENIENTES DE TOUROS JOVENS

### RESUMO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um importante patógeno do trato reprodutivo bovino que está amplamente disseminado em rebanhos de corte e leite em todas as regiões geográficas brasileiras. Touros soropositivos podem eliminar o vírus de forma intermitente pelo sêmen e, com isso, constituem em importantes veiculadores desta infecção viral para as fêmeas. Estudos mostram que touros adultos apresentam altas taxas de infecção e de eliminação do vírus no sêmen. O presente estudo foi delineado com o objetivo de avaliar a presença de BoHV-1 em amostras de sêmen provenientes de touros jovens assintomáticos em um rebanho regularmente vacinado contra o BoHV-1. Na primeira avaliação, realizada utilizando apenas touros jovens, ainda não incorporados ao sistema de reprodução, rebanho avaliado, são de touros da raça Braford, provenientes de dois duas localidades, sendo grupo 1 (G1) do estado do Paraná (n=12) e grupo 2 (G2) do estado do Rio Grande do Sul (n=37). Para a segunda avaliação, realizada um ano após, e antes da utilização dos touros em uma segunda estação de monta, foi possível coletar sêmen de 15 touros, todos avaliados na primeira avaliação, sendo cinco do G1 e 10 do G2. Todas as amostras permaneceram estocadas a -80°C até a realização dos testes. A presença do BoHV-1 nas amostras de sêmen foi avaliada por meio da amplificação de um produto com 468 pares de base do gene da gD do BoHV-1, por meio da técnica de semi nested-PCR. Nas 49 amostras de sêmen provenientes da primeira coleta o DNA do BoHV-1 foi identificado em cinco amostras(10,2%). Nos animais da segunda coleta, 15 amostras, o DNA do BoHV-1 foi amplificado em duas (13,33%) amostras, as quais haviam resultado negativo em primeira etapa. Alguns dos animais considerados positivos em primeira etapa foram reavaliados em segunda etapa, os quais foram negativos, com intervalo de um ano entre etapas. A especificidade dos produtos amplificados pela reação de semi-nestedPCR foi confirmada por meio da reação de sequenciamento e análise dos amplicons obtidos nesse estudo, que apresentaram 100% de identidade com o gene da GD do BoHV-1. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a frequência de sêmen positivo para o BoHV-1 proveniente de touros jovens e regularmente vacinados para o BoHV-1, na dependência do rebanho avaliado, pode ser baixa. Com isso, o uso dessa categoria animal em sistema de reprodução com IATF e repasse com touros, em rebanhos com vacinação regular e sistemática contra a infecção com o BoHV-1 no período pré-estação de monta, pode contribuir com a redução da circulação viral e, conseqüentemente, com a redução na taxa de excreção viral pelo sêmen.

**Palavras-chave:** Bovinos, reprodução, BoHV-1, excreção viral, diagnóstico, sêmen.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina brasileira de cria é formada por, aproximadamente, 74,5 milhões de vacas aptas à reprodução (>2 anos) (ANUALPEC, 2012). A inseminação artificial é utilizada em aproximadamente 10% do rebanho (ASBIA, 2012). A monta natural é a principal forma de reprodução na pecuária bovina de corte brasileira e, para isto, utilizando a relação touro/vaca de 1:25, são necessários 18,25 milhões de touros aptos a reprodução (PINEDA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000).

Considerando o grande número de touros utilizados anualmente pela pecuária de corte, existe a constante preocupação com a fertilidade e potencial genético dos touros jovens a serem incorporados no plantel de reprodução. Entretanto, com frequência, os aspectos sanitários do tourinho e, principalmente, do sêmen, não são avaliados e é motivo de preocupação entre os técnicos (THIRY *et al.*, 1987; SOLIS-CALDERON *et al.*, 2003; BOELAERT *et al.*, 2005; GALINA *et al.*, 2007).

Infecções sistêmicas e genitais, ocasionadas por diferentes microrganismos tais como bactérias, protozoários e vírus, interferem diretamente no desempenho reprodutivo de vacas e touros e são responsáveis por influenciar negativamente nos principais parâmetros utilizados para avaliar a eficiência reprodutiva na pecuária bovina de corte (MEYER, 2003; PITUCO, 1999). A determinação do perfil sanitário, tanto de vacas quanto de touros, é fundamental para a obtenção e manutenção da eficiência reprodutiva em rebanhos bovinos (STRAUB, 1990; TAKIUCHI *et al.*, 2005). O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um dos principais patógenos do trato reprodutivo bovino e a infecção por este agente está amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de corte e leite brasileiros (MÉDICI *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2008). A infecção primária pelo BoHV-1 é seguida de latência viral que torna o animal infectado portador assintomático e potencial transmissor do vírus por toda a sua vida produtiva. A saída do estado de latência é acompanhada de re-

excreção viral que interferiu diretamente nos aspectos epidemiológicos e de controle e profilaxia da infecção em rebanhos bovinos (KAASHOK *et al.*, 1994; OIE 2010).

O BoHV-1 é considerado o patógeno viral mais importante encontrado em sêmen bovino (ELAZHARY *et al.*, 1980; AFSHAR; EAGLESTONE, 1990). Touros recém-infectados, assim como aqueles infectados anteriormente, mas com reativação da infecção pela saída do estado de latência viral, eliminam o vírus pelo sêmen de forma intermitente (KAASHOK *et al.*, 1994; OIE 2010). A forma venérea da infecção pelo BoHV-1 pode ocorrer quando se utiliza inseminação artificial, com sêmen contaminado, ou pela monta natural com a utilização de touros portadores do vírus (ELAZHARY *et al.*, 1980; WYLER, ENGELS e SCHWYZR, 1989; VAN OIRSCHOT, 1995).

A presença do BoHV-1 no sêmen, seguida de infecção do trato reprodutivo da fêmea, pode ser responsável por várias consequências, tanto para a vaca quanto para o conceito, destacando-se entre elas casos clínicos de vulvovaginite, endometrite e mortalidade embrionária precoce e tardia, que interferem consideravelmente na eficiência reprodutiva do rebanho (STRAUB 1990; WEIBLEN, 1992; VAN OIRSCHOT *et al.*, 1993; TAKIUCHI *et al.*, 2005; ATA *et al.*, 2006).

Com frequência, em todo o mundo, são relatadas altas taxas variando de 14% a 58,8% de amostras de sêmen bovino contaminado com o BoHV-1 tanto em investigações realizadas em amostras provenientes de touros de centrais de IA (17,39% a 58,33%) (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1993; WAGTER *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 1998; DEKA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011; RANA *et al.*, 2011; WEIBLEN, 2012), quanto de animais utilizados em monta natural (14,68% a 58,8%) (OLIVEIRA *et al.*, 2011; KAUR *et al.*, 2013; DEHKORDI *et al.*, 2013). Entretanto, a grande maioria desses estudos avaliou amostras de sêmen provenientes de touros já em atividade reprodutiva, ou seja, passíveis de terem sido infectados

anteriormente, tanto pela via venérea quanto iatrogênica por meio de manipulações frequentes.

Considerando vários aspectos como a alta frequência de amostras de sêmen positivas para o BoHV-1 na maioria dos estudos realizados; a importância desse patógeno viral para o trato reprodutivo da fêmea bovina; os seus efeitos negativos nos parâmetros utilizados para avaliar a eficiência reprodutiva de vacas de rebanhos de corte comercial em regime de estação de monta natural, e até mesmo IATF com repasse com touro; a alta frequência da infecção pelo BoHV-1 identificada nos rebanhos bovinos brasileiros; a falta de informações relativas à presença do BoHV-1, em amostras de sêmen de touros jovens que ainda não entraram em reprodução; e a importância da avaliação e adoção de medidas de controle e profilaxia para essa virose, o presente estudo teve como objetivo avaliar a taxa de excreção viral por meio da técnica de Semi nested PCR em amostras de sêmen *in natura* obtidas de touros jovens, ainda não utilizados para reprodução por monta natural e vacinados.

## 5.2 MATERIAL e MÉTODOS

### *Rebanhos*

Os touros jovens avaliados neste estudo foram provenientes de dois rebanhos, sendo um do estado do Rio Grande do Sul (RS) e outro do estado do Paraná (PR). Os rebanhos são da raça Braford mantidos em condições de campo em sistema de criação extensivo. Ao desmame, realizado com aproximadamente sete meses de idade, os animais foram transferidos para uma terceira propriedade rural localizada no estado do Paraná e também mantidos sob regime extensivo de pastagem e sal mineral. Como parte do manejo sanitário, os animais receberam vacinas contra Febre Aftosa, de acordo com o calendário oficial para a região, e Clostrídeos. Como parte do manejo pré-estação de monta, os tourinhos receberam duas doses,

com intervalo mínimo de 21 dias, de vacina contra doenças infecciosas da reprodução constituídas, além do BoHV-1, também por cepas inativadas do Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) e cinco sorovares de *Leptospira* sp. Os tourinhos foram também submetidos a tratamentos estratégicos para o controle de endo e ectoparasitas. Os animais incluídos no estudo, todos animais eram assintomáticos, e para a realização da coleta de sêmen, os animais foram separados em Grupo 1 (G1) do Paraná e Grupo 2 (G2) do Rio Grande do Sul.

#### *Amostras de sêmen*

Foram realizadas duas coletas de sêmen. A primeira coleta ocorreu anteriormente à utilização dos touros em sua primeira estação de monta e foi realizada em julho de 2012. Os animais estavam com, aproximadamente, 20 meses de idade, e foram colhidas amostras de sêmen de 49 tourinhos sendo 12 amostras provenientes de touros do G1 e 37 amostras do G2. A segunda amostragem foi realizada em setembro de 2013, no intervalo entre a primeira e segunda estação de monta, quando os touros estavam com aproximadamente 34 meses de idade. A segunda amostragem foi constituída por cinco amostras de sêmen provenientes de touros do G1 e 10 amostras do G2, totalizando 15 amostras. O restante dos animais foram vendidos ou descartados.

Todas as amostras de sêmen foram coletadas por eletroejaculação de acordo com a metodologia empregada na realização de exames andrológicos de rotina. Uma alíquota de cada amostra, com aproximadamente 1 mL de cada sêmen, foi transferida para tubos plásticos tipo “eppendorf”, transportada sob refrigeração e mantida estocada a -80°C até a realização dos testes para a identificação do BoHV-1, além dos parâmetros qualitativos e quantitativos em exame andrológico de rotina.



### *Extração de ácido nucleico*

As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C e diluídas na proporção 1:10 em PBS pH 7,2 (137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Alíquotas de 500 µL foram incubadas com tampão de lise (10% SDS e 0,2 mg/mL proteinase K) a 56°C por 30 min. Posteriormente, o ácido nucléico foi extraído pelo método da sílica/isotiocianato de guanidina, de acordo com o protocolo descrito por Boom *et al.* (1990). O ácido nucleico extraído foi eluído em 50 µL de água ultrapura estéril tratada com DEPC (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

### *Semi nested – PCR (SN-PCR)*

A presença de DNA de BoHV-1 nas amostras de sêmen foi avaliada por meio da técnica de *semi nested*-PCR, de acordo com metodologia descrita por Takiuchi *et al.* (2005). Para a primeira etapa de amplificação, foram utilizados 5µL do ácido nucléico extraído e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) P3 *sense* 5'GCTGTGGGAAGCGGTACG3' (nt. 351-368) e P4 *anti-sense* 5'GTCGACTATGGCCTTGTGTGC3' (nt. 817-796), desenhados para a amplificação de um produto com 468 pares de bases (pb) do gene que codifica para a glicoproteína D (gD) do BoHV-1. Na segunda etapa de amplificação foram utilizados 2 µL do produto da primeira amplificação e os *primers* P5 *sense* 5'ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG 3' (nt 394-422) e P4 *anti-sense*, que amplificam um produto com 425 pb.

Alíquotas de 10 µL dos produtos amplificados na *semi nested* PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (100V) por 60 min, corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta.

### *Sequenciamento*

Os produtos da amplificação considerados de melhor qualidade (intensidade) foram selecionados para avaliação da especificidade por meio de sequenciamento de nucleotídeos. Os *amplicons* foram purificados e sequenciados utilizando *kits* comerciais Pure Link™ Quick Gel Entracion & PCR Purification Combo (Invitrogen®, Life-Technologies, Löhne, Germany) e sequenciados com o kit Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems®, Austin, TX, EUA), em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), com ambos os *primers* P5 *sense* e P4 *anti-sense*. A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelos programas Phred/ Phrap/Consed Analysis Program (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) e a identidade dos produtos foi comparada com as sequências depositadas em bases públicas de dados (GenBank, *National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA) utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 5.3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

O DNA do BoHV-1 foi identificado por *semi-nested-PCR* no sêmen de touros jovens realizadas nas duas coletas e ambos os grupos avaliados. A Tabela 1 estão distribuídos os resultados positivos para a identificação do gD do BoHV-1 em sêmen bovino, de acordo com os períodos de colheita e região de origem dos rebanhos avaliados.

Os quatro *amplicons* da *semi-nested-PCR* selecionados para a reação de sequenciamento de nucleotídeos, que foi realizada para a análise da especificidade dos produtos amplificados, confirmaram a amplificação parcial do gene gD de BoHV-1 .

**Tabela 1** Detecção do gene gD do BoHV-1 por meio da técnica de *semi nested*-PCR realizada em amostras de sêmen de touros jovens, distribuídas de acordo com o período de colheita e região de origem dos rebanhos avaliados

Colheita	Ano	Grupos	Número de Amostras	
			Colhidas	Positivas (%)
Virgens	2012	G1	12	1
	2012	G2	37	4
	<b>Sub-total</b>		<b>49</b>	<b>5 (10,2)</b>
Após 1ª Estação	2013	G1	5	0
	2013	G2	10	2
	<b>Sub-total</b>		<b>15</b>	<b>2 (13,3)</b>
<b>Total</b>			<b>64</b>	<b>7 (10,9)</b>

A presença do BoHV-1 não interferiu nos principais parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade do sêmen bovino tais como vigor, motilidade, turbilhonamento e defeitos, uma vez que as sete amostras positivas na *semi nested*-PCR apresentaram resultados satisfatórios nos exames andrológicos, sendo os touros considerados aptos à reprodução.

No período compreendido entre a primeira e a segunda estação de monta, dentre as amostras de sêmen positivas na primeira coleta, apenas três foram reavaliados na segunda etapa, devido a venda dos animais, e foram negativos. Os dois touros nos quais as amostras de sêmen foram positivas na segunda avaliação apresentaram resultados negativos por ocasião da primeira avaliação. Estes resultados demonstram que a excreção viral pelo sêmen é intermitente e que touros infectados podem apresentar ejaculados com e sem vírus ou que foram infectados por via venérea

Com frequência os resultados sobre a identificação de BoHV-1 em sêmen bovino são superiores aos encontrados no presente estudo. Deka *et al.*, (2005), Weiblen, (2012) e Rana *et al.*, (2011) obtiveram 58,33%, 18%, 17,39%, respectivamente.

Rocha *et al.*, (1998), com *nested*-PCR, descreveram que 31,7% das amostras de sêmen provenientes de touros adultos alojados em central de IA eram positivas para o BoHV-1. Oliveira *et al.* (2011), utilizando também a técnica de *nested*PCR identificaram o BoHV-1 em amostras de sêmen frescos de touros, 58,8% e 47,3% positivos no Rio Grande do Sul (RS), raças Angus e Hereford e Goiás de touros Nelore, ambos a pasto e idade média entre dois e três. No mesmo estudo já com sêmen congelado de animais de central de IA, com idade variando de três a sete anos, obtiveram 21,7% positivos, em animais sem presença de assintomáticos. Resultados mais próximos ao obtido neste estudo foram obtidos por Dehkordi (2013), obtendo 14,68% em amostras de sêmen bovinos a pasto, utilizando PCR.

Entretanto, a maioria dos estudos disponíveis na literatura foi realizada com amostras de sêmen provenientes de touros adultos que já estavam em trabalho de reprodução por mais de 3 a 5 anos (ROCHA *et al.*, 1998; DEKA *et al.* 2005; DIALLO, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; RANA *et al.*, 2011; WEIBLEN, 2012). O presente estudo foi delineado justamente com o objetivo principal de avaliar o perfil sanitário para o BoHV-1 em amostras de sêmen provenientes de touros jovens, ainda não inseridos em trabalho de reprodução por monta natural. Apesar de verificarmos excreção viral no sêmen, o percentual de 10,2 e 13,3% de touros onde o BoHV-1 foi encontrado no sêmen, na primeira e segunda coletas, respectivamente, foi inferior aos relatados na literatura que, com frequência, oscilam entre 14% a 58,8% de amostras positivas (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1993; WAGTER *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 1998; DEKA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011; RANA *et al.*, 2011; WEIBLEN, 2012; KAUR *et al.*, 2013; DEHKORDI *et al.*, 2013).

A frequência de resultados positivos para o BoHV-1 em amostras de sêmen pode variar de acordo com a sensibilidade da técnica utilizada no diagnóstico. Para contornar essas desvantagens, várias estratégias de PCR foram desenvolvidas para a identificação do DNA de BoHV-1 em sêmen bovino. Na grande maioria das avaliações, principalmente por não exigir a

viabilidade da partícula viral, as várias estratégias de PCR são mais sensíveis e específicas que o isolamento viral em cultivo celular (WIEDMANN *et al.*, 1993; VILCEK *et al.*, 1994; ENGELBURG *et al.*, 1995; WAGTER *et al.*, 1996; TAKIUCHI *et al.*, 2003). Porém, em algumas situações, inibidores da reação de PCR presentes no sêmen podem interferir nos resultados (ENGELBURG *et al.*, 1995; TAKIUCHI *et al.*, 2005). A técnica selecionada para o diagnóstico do BoHV-1 em amostras de sêmen de touros jovens no presente estudo foi a semi nested PCR, que consiste na realização sequencial de duas etapas de amplificação. Essa estratégia foi adotada justamente para aumentar a sensibilidade do sistema de diagnóstico reduzindo assim a probabilidade de reações falso-negativas (TAKIUCHI *et al.*, 2003 e 2005). Com isso, o baixo percentual de amostras de sêmen positivas para o BoHV-1 identificado nesse estudo, em comparação com os maiores percentuais descritos na literatura, não pode ser considerado um viés na metodologia de diagnóstico empregada mas sim na menor frequência de infecção em touros jovens. Em contraposição, a maior probabilidade de ocorrência de reações falso-positivas quando são utilizadas técnicas de *nested-PCR* também pode ser descartada em nosso estudo, entre outros motivos por i) baixa frequência de amostras positivas; ii) cuidados adotados na elaboração da técnica com a realização, em ambientes separados, das etapas de extração de ácido nucleico, a primeira e a segunda etapa de amplificação e a análises dos produtos amplificados; iii) e, principalmente, pela confirmação da especificidade dos produtos amplificados no sequenciamento de nucleotídeos.

As amostras de sêmen incluídas na segunda colheita foram provenientes de touros que já haviam estado em serviço de reprodução por uma estação de monta. Entretanto, o percentual de amostras positivas, igualmente à primeira avaliação, também foi baixo. A vacinação regular do rebanho de reprodução, incluindo fêmeas e machos, com vacina comercial contendo o BoHV-1 contribui com a redução na circulação viral e, conseqüentemente, reduz a taxa de infecção no rebanho (VAN OIRSCHOT, 1999; FRANCO

*et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2009). Ambos os rebanhos incluídos na presente análise utilizavam vacinação regular com vacinas comerciais múltiplas contendo, além do BoHV-1, outros patógenos da esfera reprodutiva de bovinos. Esse manejo sanitário, que incluiu a imunoprofilaxia de machos e fêmeas aliado a não entrada de animais de terceiros, pode ter contribuído com a redução da circulação viral no rebanho e, com isso, justificar a baixa frequência (13,3%) de amostras de sêmen positivas para o BoHV-1 identificada também nas amostras de sêmen provenientes da segunda colheita realizada em touros já utilizados em uma estação de reprodução, em comparação a dados já descritos.

Os resultados obtidos nesse estudo nos permitem concluir que a frequência de sêmen positivo para o BoHV-1 proveniente de touros jovens e regularmente vacinados contra esse vírus, na dependência do rebanho avaliado, foi baixa. Com isso, o uso dessa categoria animal em sistema de reprodução com IATF e repasse com touros em rebanhos com vacinação regular e sistemática contra a infecção com o BoHV-1 no período pré-estação de monta pode contribuir com a redução da circulação viral e, conseqüentemente, com a redução na taxa de excreção viral pelo sêmen.

A presença de animais positivos antes da primeira estação de monta, podemos delinear algumas hipóteses: como machos montando uns aos outros, hábito de higiene (lambeduras), contato com animais positivos em fase amamentação e etc.

#### 5.4 REFERÊNCIAS

AFSHAR, A.; EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. **Veterinary Bulletin**, v.60, n.2, p.93-109, 1990.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA. **ANUALPEC 2012**. São Paulo: Informa Economics FNP, 2012. 378 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL - ASBIA. **Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen**, 2012. Disponível em: <http://www.cigeneticabovina.com.br> Acesso em: 19/ago./2014

ATA, A. et al. The effect of sub-clinical bovine herpesvírus 1 infection on fertility of cows and heifers. **Acta Veterinary**, v.56, p.267-273, 2006.

BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T. Soroprevalência e fatores de riscos para a infecção pelo Herpesvírus bovino tipo 1(BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1368-73, 2005.

BOELAERT, F. et al. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity, Preventy. **Veterinary Medicine**, v.69, p.285-295, 2005.

BOOM, R.et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

CHANDRANAİK, B.M. et al. Isolation of BHV-1 from bovine semen and application of real time PCR for diagnosis of IBR/IPV from clinical samples. **Veterinary Archive**, v.80, n.4, p.467- 475, 2010.

CLAUS, M. P.et al. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C in clinical specimens by multiplex-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.128, p.183-188, 2005.

DEKA, D.; RAMNEEK MAITI, N.K ; OBERI, M.S. Detection of bovine herpesvírus -1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. **Rev. Science Technology off Intituty Epizooty**, v.24, n.3, p.1085-1094, 2005.

DELVKORDI, F. et al. Conventional Vs Real-Time PCR for detection of bovine herpes virus type 1 in aborted bovine, buffalo and camel foetuses. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.16, n.2, p. 102-111. 2013.

DIALLO, I.S. et al. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Australian Veterinary**, v.88, p.93-95, 2010.

DIAS, J.A.et al. Risk Factors for bovine herpervírus 1 infection in cattle herds in the west region of state. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.3, p.161-168, 2008.

ELAZHARY, M.A.S.Y.et al. Bovine herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. **The Canadian Veterinary Journal**, v.21, n.12, p.336-339, 1980.

ENGELBURG, F.A.C. et al. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. **Journal of clinical Microbiology**, v.33, n.2, p.308-312, 1995.

FRANCO, AC. et al. Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.135-40, 2002.

GALINA, C.S.; HORN, M.M.; MOLINA, R. Reproductive behaviour in bulls raised under tropical and subtropical conditions. **Hormones and behavior**, v.52, n.1, p.26-31, 2007.

ISCAN, U.T. ; DUMAN, R. Bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) prevalence in dairy cattle. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v.10, n.12, p.1523-1525, 2011.

KAASHOK, M.J. et al. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. **Vaccine**, v.12, n.5, p.439-444, 1994.

KAUR, G. et al. Prevalence of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in cattle and Buffaloes in Punjab. **Veterinary world**, v.6, n.6, p. 343-345, 2013.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v.30 , n.2, p.347-350, 2000.

MEYER, A.D. Comparação das técnicas de isolamento viral e nested PCR na detecção do BHV-1 em sêmen bovino experimentalmente e naturalmente contaminado. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.70, n.2, p.123-126, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OIE). Coleta e tratamento de sêmen bovinos e pequenos ruminantes. In: **Código sanitário para animais terrestres**. Paris, France, 2010. cap. 4.5

OLIVEIRA, M.T. et al. . Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v.75, p.1139-1145, 2011.

PINEDA, N.R.; FONSECA, V.O.; PROENÇA, R.V. Potencial reprodutivo de touros Nelore: libido, capacidade de serviço e eficiência em acasalamentos com elevada proporção de vacas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, n.1, p.44-51. 2000.

PITUCO, E.M. et al. Detecção de anticorpos em bovinos contra o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em rebanhos de corte e leite com problemas reprodutivos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, p.1-171, 1999.

RANA, S.K. et al. Use of real time polymerase chain reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo sêmen in Índia. **Veterinary Italian**, v.47, n.3, p.313-322, 2011.

ROCHA, M. A. et al. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v.63, n.1, p.1-11, 1998.



- SANTOS, M.D., et al. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore em monta natural submetidos às proporções touro: vaca de 1:25, 1:50, 1:75 E 1:100. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRAZILEIRA DE ZOOTECNIA, 32, 2000, **Anais ...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000.
- SILVA, A.D. et al. Efficacy of a gE-deleted, bovine herpesvírus 1 (BoHV-1) inactivated vaccine, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.7, p.545-551, 2009.
- SOLIS-CALDERON, J.J. et al. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v.57, n.4, p.199–208, 2003.
- STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis vírus. In: DINTER, Z.; MORUN, B. **Virus Infectious of Ruminants**. Amsterdam: *Elsevier Science Publishers*, 1990. p.71-108.
- TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p.203-209, 2001.
- TAKIUCHI, E. et al. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (*semi-nested* PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p.43-56, 2003.
- TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. et al. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Research Veterinary Science**, v.79, n.1, p.85-88, 2005.
- THIRY, E. et al. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport, **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.10, p.59–63, 1987.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; STRAVER, P.J.; LIESHOUT, J.A.M.. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. **Veterinary Record**, v.132, n. 2, p.32-35, 1993.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; Bovine Herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Veterinary Quarterly**, v.17, n.1, p.29-33, 1995.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal Biotechnology**, n.73, p. 195-205, 1999.
- VILCEK, S. et al. Rapid detection of bovine herpesvírus -1, (BHV-1) using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.42, n.1, p.53-64, 1994.
- WAGTER, L.H.A. et al. A polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in selectively digested whole bovine semen. **Veterinary Research Community**. v.20, n.4, p.401- 408, 1996.
- WEIBLEN, R. Doenças víricas que interferem na produção leiteira. In: CHARLES, T.P. FURLONG. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: *EMBRAPACNPGL*, 1992. p.174

WIEDMANN, M. et al. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v.44, n.1, p.129- 140, 1993.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis / vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.1-72

## **6. CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

- A frequência de sêmen positivo para o BoHV-1 (10,9%) proveniente de touros jovens e regularmente vacinados contra este vírus, na dependência do rebanho avaliado, foi baixa. Com isso, o uso dessa categoria animal em sistema de reprodução com IATF e repasse com touros, em rebanhos com vacinação regular e sistemática contra a infecção com o BoHV-1 no período pré-estação de monta, pode contribuir com a redução da circulação viral e, conseqüentemente, com a redução na taxa de excreção viral pelo sêmen.
- A Técnica Semi nested-PCR é segura ao analisar a presença de BoHV-1 em sêmen bovino.
- Necessidade de maior atenção em manejo e profilaxia em animais destinados a reprodução.

## **7. APÊNDICES**

## 7. APÊNDICES

### APÊNDICE A: Lista de reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25 µmol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies®)
2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies®)
3. 123 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies®)
4. 2-Mercapto-ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) P.M. 78,13 (Fluka®)
5. Acetona, P.A. (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
6. Ácido acético glacial, P.A. (CH<sub>3</sub>COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
7. Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) P.M. 61,83
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
9. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O) P.M. 372,24 (Reagen®)
10. Agarose (Gibco BRL®)
11. Álcool etílico absoluto (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
12. Álcool isoamílico ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>H</sub>C<sub>H</sub>2CH<sub>2</sub>OH) P.M. 88,15 (Synth®)
13. Azul de bromofenol (Sigma®)
14. Cloreto de Potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
15. Cloreto de Sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
16. Clorofórmio, P.A. (CHCl<sub>3</sub>) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
17. Dodecil Sulfato de Sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) P.M. 288,38 (Synth®)
18. Ethidium bromide (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br) P.M. 394,3 (Sigma®)
19. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL®)
20. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica®)
21. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab®)
22. Metanol, P.A. (CH<sub>3</sub>OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
23. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (
24. *Silicon dioxide* (SiO<sub>2</sub>) P.M. 60,08 (Sigma®)

## APÊNDICE B: Soluções e Tampões

- **Tampão de Amostra**

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose – sucrose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) 45%

- **Tampão de corrida: TBE (TRIS – Ácido bórico – EDTA) 10 x [ ]**

- 0,89 M TRIS
- 0,89 M ácido bórico
- 0,02 M EDTA dissodium
- Água bidestilada q.s.p. 1L

pH 8,4

- **Salina Tamponada por fosfatos (PBS)**

- 137 mM cloreto de sódio (NaCl)
- 3 mM cloreto de potássio (KCl)
- 8 mM fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4$ )
- 15 mM fosfato de potássio monobásico ( $K_2H_2PO_4$ )
- Água ultrapura autoclavada q.s.p. 1L

pH 7,2

- **Oligonucleotídeos**

- P3 *sense* 5'GCTGTGGGAAGCGGTACG3' (nt. 351-368)
- P4 *anti-sense* 5'GTCGACTATGGCCTTGTGTGC3' (nt. 817-796),
- P5 *sense* 5'ACGGTCATAT GGTACAAGGACAGCG 3' (nt 394-422)

- **Preparação dos oligonucleotídeos**

Eluição do primer liofilizado para concentração final de 200 pmol (primer mãe):

$$\frac{\text{Concentração em nm x 1000}}{200 \text{ pmol}} = \text{volume em } \mu\text{L de água ultrapura a ser adicionado}$$

Diluição do primer mãe para concentração final de 20 pmol (primer uso):

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$\begin{aligned} - 103 \text{ sense} &\rightarrow \frac{41,26 \text{ nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = 206,3 \mu\text{L} \text{ (primer mãe a 200 pmol)} \\ &200 \text{ pmol} \end{aligned}$$

$$\rightarrow 200 \times V_i = 20 \times 100 \rightarrow V_i = 10 \mu\text{L}$$

Para uso: Diluir 10  $\mu\text{L}$  de primer mãe em 90  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

$$\begin{aligned} - 372 \text{ anti-sense} &\rightarrow \frac{40,96 \text{ nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = 204,8 \mu\text{L} \text{ (primer mãe a 200 pmol)} \\ &200 \text{ pmol} \end{aligned}$$

$$\rightarrow 200 \times V_i = 20 \times 100 \rightarrow V_i = 10 \mu\text{L}$$

Para uso: Diluir 10  $\mu\text{L}$  de primer mãe em 90  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

$$\begin{aligned} - \text{BD1 sense} &\rightarrow \frac{20,84 \text{ nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = 104,2 \mu\text{L} \text{ (primer mãe a 200 pmol)} \\ &200 \text{ pmol} \end{aligned}$$

$$\rightarrow 200 \times V_i = 20 \times 100 \rightarrow V_i = 10 \mu\text{L}$$

Para uso: Diluir 10  $\mu\text{L}$  de primer mãe em 90  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

$$\begin{aligned} - \text{BD3 anti-sense} &\rightarrow \frac{17,45 \text{ nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = 87,25 \mu\text{L} \text{ (primer mãe a 200 pmol)} \\ &200 \text{ pmol} \end{aligned}$$

$$\rightarrow 200 \times V_i = 20 \times 100 \rightarrow V_i = 10 \mu\text{L}$$

Para uso: Diluir 10  $\mu\text{L}$  de primer mãe em 90  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.



## APÊNDICE C: Kits

- Pure Link™ Quick Gel Entracion & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen®, Life-Technologies, Löhne, Germany)
- Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems®, Austin, TX, EUA)

## APÊNDICE D: Protocolo de Técnicas

- **Diluição das amostras 1:10**
  1. 50µl sêmen em 450µl de PBS
- **Extração do DNA utilizando reagente Boom**
  1. Adicionar 500 µL de L6
  2. Adicionar 25µl sílica
  3. Agitar o microtubo em vortex por 15s
  4. Agitar por 30 min a temperatura ambiente
  5. Centrifugar por 1 min a 12.000 x g (2 a 8°C)
  6. Desprezar o sobrenadante.
  7. Adicionar 500 µL de L2
  8. Homogeneizar em Vortex
  9. Centrifugar por 1 min a 12.000 x g (2 a 8°C) = 2x
  10. Desprezar o sobrenadante.
  11. Adicionar 1000µl etanol 70%
  12. Vortexar
  13. Centrifugar por 1 min a 10.000 x g (2 a 8°C) = 2x
  14. Descartar o sobrenadante
  15. Adicionar 1000µl Acetona
  16. Vortexar
  17. Centrifugar por 1 min a 10.000 x g (2 a 8°C)
  18. Descartar o sobrenadante e deixar secar em banho maria a 56°C por 15 min.
  19. Adicionar 50 µL de água DEPEC
  20. Vortexar

21. Incubar por 15 min a 56°C
22. Centrifugar por 4 min a 10.000 x g (2 a 8°C)
23. Recolher o sobrenadante

- **Reações da PCR**

**Mix PCR**

Água (28,8 µL)  
 Buffer 10 x (5 µL)  
 Dntp (4 µL)  
 MgCl<sub>2</sub> (1,5 µL)  
 P3 (1 µL)  
 P4 (1 µL)  
 Taq (0,5 µL)  
 DmsO (3,2µl)

**Semi Nested**

P4 (1 µL)  
 P5 (1 µL)  
 Dntp (4 µL)  
 MgCl<sub>2</sub> (1,5 µL)  
 Buffer 10 x (5 µL)  
 Taq (0,5 µL)  
 DmsO (3,2µl)  
 Água (31,2 µL)

- **Gel de agarose a 2%**

- 1 g de agarose
- 50 mL TEB 1 x
- 30 µL de brometo de etídio

- **Pure Link™ Quick Gel Entracion & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen®, Life-Technologies, Löhne, Germany)**

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.
2. Adicionar 10 µL do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de gel.
3. Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min.
4. Centrifugar a 16.000 x g / 30 s
5. Transferir 600 µL da amostra com o *Capture buffer type 2* em um tubo coletor com coluna
6. Incubar em temperatura ambiente por 1 min
7. Centrifugar a 16.000 x g / 30 s

8. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
  9. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  do *Wash buffer type 1* na coluna com tubo coletor
  10. Centrifugar a 16.000 x g / 30 s
  11. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
  12. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  do *Elution buffer type 6*
  13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
  14. Centrifugar a 16.000 x g / 1 min.
  15. Estocar o DNA purificado em  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- **Quantificação de produto de PCR em Qubit<sup>TM</sup> fluorometer (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA)**
    1. Preparar a solução *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT<sup>TM</sup>* no *Buffer Quant-iT<sup>TM</sup>*, 1:200. São necessários 200  $\mu\text{L}$  desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
    2. Homogeneizar em vórtex.
    3. No microtubo das amostras adicionar 198  $\mu\text{L}$  da solução *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* a 2  $\mu\text{L}$  do DNA purificado.
    4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190  $\mu\text{L}$  da solução *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* a 10  $\mu\text{L}$  do padrão 0.
    5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190  $\mu\text{L}$  da solução *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* a 10  $\mu\text{L}$  do padrão 100.
    6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s
    7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
    8. Realizar a leitura usando *Qubit<sup>TM</sup> fluorometer (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA)*
    9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.