

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Campus São Gabriel

Bacharelado em Biotecnologia

KELVIN HENRIQUE MAC DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SÊMEN BOVINO E REVISÃO SOBRE
FERTILIDADE BOVINA**

São Gabriel

2014

KELVIN HENRIQUE MAC DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SÊMEN BOVINO E REVISÃO SOBRE
FERTILIDADE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso a ser apresentado no *campus* de São Gabriel da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Professor Paulo Marcos Pinto

São Gabriel

2014

KELVIN HENRIQUE MAC DE OLIVEIRA

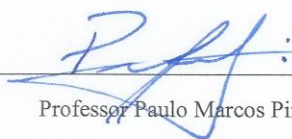
**EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SÊMEN BOVINO E REVISÃO
SOBRE FERTILIDADE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso a ser
apresentado no *campus* de São Gabriel da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
Animal

Trabalho de Conclusão defendido e aprovado em 22 de Agosto de 2014

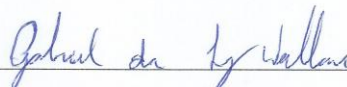
Banca Examinadora:



Professor Paulo Marcos Pinto

Orientador

UNIPAMPA



Professor Gabriel da Luz Wallau

UNIPAMPA



Professor Luís Fabiano Santos da Costa

UNIPAMPA

RESUMO

A fertilidade dos bovinos é um fator de importância para o mercado pecuário. Diversas estratégias de manejo são utilizadas visando uma melhora na capacidade reprodutiva dos animais, pois a ocorrência de limitação da fertilidade acarreta perdas econômicas aos produtores. As causas para limitação são variadas, qualquer interferência como: má nutrição; manejo inadequado, fatores genéticos, alterações climáticas, distúrbios hormonais e doenças. Um dos problemas mais comuns que é limitante a fertilidade bovina são os distúrbios causados por micro-organismos onde afetam a fertilidade animal por meio de doenças como a leptospirose, ou por contaminações e infecções de órgãos genitais e sêmen. Porém mesmo com estes prejuízos ao índice reprodutivo de rebanhos causado por micro-organismos, sabe-se que animais possuem cerca de dez vezes mais células microbianas do que células próprias em seus corpos. Estes micro-organismos conhecidos como Microbiota são importantes, pois fornecem alguma colaboração em processos essenciais do animal. Portanto, deve-se ter em mente que, podem existir níveis aceitáveis de presença de micro-organismos, não causando um impacto negativo tão forte a ponto de comprometer a eficiência reprodutiva do animal. Quando pesquisado na literatura global percebe-se que ainda não há dados que relacionam micro-organismos com a influência do tempo e experiências do animal. Por este motivo é interessante a realização de estudos que levem a caracterização desta “microbiota” e comparar se a influência do tempo e experiências em cópulas do animal pode causar alterações nesta microbiota que acarretariam em impactos negativos levando a limitação da fertilidade animal. Portanto este trabalho tem como objetivo caracterizar a microbiota presente no sêmen bovino de Novilhos menor de 2 anos virgens e Adultos com aproximadamente 4 anos e experientes. Utilizamos oito touros da raça Hereford para a coleta de amostras. Realizamos a extração de DNA destas amostras utilizando dois protocolos de dois kits de extração. Para avaliação dos resultados da extração realizamos a revelação de géis de agarose 0,8%, notamos em todos os géis inconsistências na extração, o que nos impossibilitou de prosseguir com os próximos passos do trabalho. Concluímos que as metodologias de extração de DNA testadas não foram eficientes devido à falta de reprodutibilidade, novos experimentos deverão ser realizados para uma melhor extração e o prosseguimento do trabalho.

Palavras-chaves: Fertilidade, Micro-organismos; Sêmen; Microbiota; Extração de DNA.

ABSTRACT

The fertility of cattle is an important factor for the livestock market. Several management strategies are used targeting a improvement in reproductive capacity of animals, since the occurrence of limiting fertility causes economic losses to producers. The causes are varied limitation, any interference such as poor nutrition; inadequate management, genetic factors, climate change, hormonal disorders and diseases. One of the most common problems that are limiting bovine fertility disorders are caused by micro-organisms which affect animal fertility through diseases such as leptospirosis, or contaminations and infections of the genital organs and semen. But even with these losses to livestock breeding index caused by microorganisms, it is known that animals have about ten times more cells than microbial cells in their own bodies. These micro-organisms known as microbiota are important because they provide some collaboration in key processes of the animal. Therefore, it should be borne in mind that there may be an acceptable level of presence of micro-organisms, not causing such a strong negative impact on the point of compromise reproductive efficiency of animals. When researching the global literature one realizes that there is no data that relate micro-organisms with the influence of time and experiences of the animal. For this reason it is interesting to conduct studies leading to the characterization of this "microbiota" and compare the influence of time and experience in the animal copulations this microbiota can cause changes that would entail negative impacts leading to limitation of animal fertility. Therefore this study aims to characterize the present microbiota in bovine semen, Steers (less than 2 years virgins) and adults (approximately four years and experienced). We use eight Hereford bulls for sampling. We performed the extraction of DNA from these samples using two protocols of two extraction kits. To evaluate the results of extraction performed revealing 0.8% agarose gels, we noted inconsistencies in all gels in the extraction, which prevented us from proceeding with the next steps of the work. We conclude that the methodologies for extracting DNA tested were not effective due to lack of reproducibility, further experiments should be conducted to better extraction and further work.

Keywords: Fertility, Micro-organisms; Semen; Microbiota; DNA extraction.

SUMARIO

1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E INTRODUÇÃO	7
1.1	Fertilidade em bovinos	7
1.2	Fertilidade, micro-organismos e técnicas de detecção	9
2.	OBJETIVO	11
2.1	Objetivos Específicos	11
3.	MATERIAS E MÉTODOS	12
3.1	Coleta de sêmen	12
3.2	Extração de DNA das amostras	13
3.2.1	<i>QIAamp DNA mini Kit</i>	13
3.2.2	<i>Genomic DNA Isolation Kit</i>	14
3.3	Eletroforese em gel de agarose	14
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	17
	REFERÊNCIAS	18

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E INTRODUÇÃO

1.1 Fertilidade em bovinos

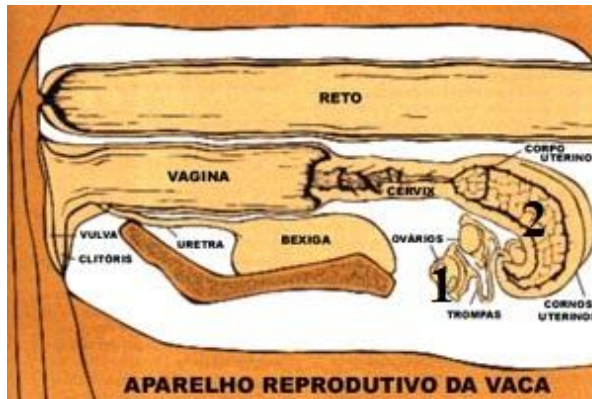
Fertilidade é a capacidade dos indivíduos de se reproduzirem com a finalidade de manutenção da espécie. Em fêmeas bovinas a fertilidade é definida como capacidade de conceber e manter uma gestação até o final, produzir crias sadias e viáveis. Os parâmetros para medir a fertilidade de um rebanho são: índice de inseminação; percentagem de gestação; percentagem de parição e intervalos entre partos (IA, 2012). A fertilidade é sem dúvida uma característica a ser considerada quando observamos o mercado de produção de carne e leite, economicamente, o mérito reprodutivo é cinco vezes mais importante para o produtor do que o desempenho e crescimento animal e dez vezes mais importante que a qualidade do produto (BARBOSA, 2005). Por este motivo na pecuária bovina o desempenho reprodutivo e produtividade do animal recebe um grande enfoque, onde diversas alternativas de manejo reprodutivo são utilizados com o objetivo de otimização dessa capacidade de forma racional, econômica e sem promover a degradação ambiental. Alguns exemplos de práticas de manejo empregadas para melhoria da produtividade são: a desmama antecipada, a suplementação estratégica dos bezerros ou vacas e o estabelecimento de um período de monta (VALLE, 1998).

Porém quando há influência negativa sobre a fertilidade destes animais, o produtor receberá prejuízos. As causas para a limitação são variadas, qualquer interferência em qualquer nível da reprodução do animal desde o desenvolvimento e maturação folicular, o coito, ovulação, fertilização e implantação do embrião, podem acarretar em perdas. Como exemplos de interferências podem citar: má nutrição; manejo inadequado, fatores genéticos (congenitos), alterações climáticas (ambientais), distúrbios hormonais e doenças (MUKASA-MUGERWA, 1989). Quando focamos em fêmeas bovinas a sua fertilidade pode ser comprometida pela influencia de fatores além dos previamente citados e mais específicos a ela, como falha na ovulação, padrões anormais no ciclo estral, e perdas embrionárias e fetais (LUCENA, G. M. A., 2008). Enquanto que em machos bovinos pode ser devido à nutrição do animal, inadequado manejo, clima e\ou sanidade, deficiência na espermatogênese, alterações no trato genital do touro sendo por ordem ambiental; genética; infecciosa ou traumática. Como exemplo pode-se mencionar: patologias ligadas à bolsa escrotal e testículos (como a hipoplasia testicular; alterações inflamatórias; neoplasia; e também a desregulação da temperatura dessa região pode causar problemas na espermatogênese); patologias ligadas ao epidídimo (inflamações causam impedimento do transporte de espermatozoides; hipoplasia e

aplasia segmentar; epididimite); patologias ligadas ao prepúcio e pênis (afeta a capacidade dos animais em realizar a cópula; balanite – inflamação da glândula, postite – inflamação do prepúcio; alterações penianas como o desvio ventral do pênis e hematomas) e patologias das glândulas anexas que incluem a próstata, bulbouretrais, glândulas vesiculares e ampolas dos ductos deferentes (suas patologias podem ser cistos, neoplasias, e inflamações). Todos estes fatores podem levar a uma subfertilidade e infertilidade. Portanto para que o macho tenha um alto potencial reprodutivo todos estes fatores são levados em conta (BICUDO, 2007).

Outro problema comum que afeta a fertilidade em bovinos são os distúrbios reprodutivos de origem infecciosa, que são causados por diferentes micro-organismos como bactérias, vírus, protozoários e até mesmo micotoxinas de fungos, ou seja, multietiológicos, podendo agir de forma isolada ou associada para causar a enfermidade (BARCELOS, 2009). Em fêmeas vulneráveis a infecção podem causar complicações que resultem em deficiência na sua fertilidade, seja devido a abortos causados por enfermidades reprodutivas ou atrasos na ciclicidade e foliculogênese. É comum a ocorrência de infecção uterina que estimula o aumento da secreção de prostaglandina no útero devido a toxinas bacterianas, o que retarda o aparecimento da ciclicidade. Outros exemplos são Infecções Uterinas que ocorrem após o parto devido a sequelas deixadas pela retenção das membranas fetais e distocia, assim como Endometrite que é uma inflamação do endométrio (GONÇALVES, 2005), abaixo a representação esquemática do trato genitais da fêmea (Figura 1), trato genital do macho (Figura 2), contendo indicação esquemática dos locais em que ocorrem alguns problemas que afetam a fertilidade dos animais.

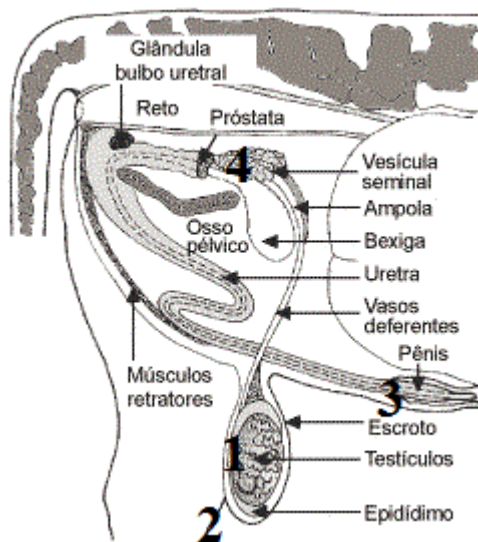
Além destas complicações por infecção também há risco de enfermidades causadas por micro-organismos contagiosos, onde principais enfermidades reprodutivas que acometem bovinos são caracterizadas por causar altos impactos nos índices de natalidade, taxa de prenhez, retardamento do retorno ao cio, dentre outros prejuízos. As mais comuns são Brucelose, Leptospirose, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Diarréia Viral Bovina e Tricomonose.



1- Falha na ovulação; maturação folicular; atrasos na ciclicidade e foliculogênese.

2- Falha durante Implantação do Embrião; Infecção Uterina; Endometrite; Retenção de Membranas Fetais; Abortos.

Figura 1: Esquema demonstrativo dos locais em que ocorrem os principais problemas de fertilidade em vacas. Fonte: Figura adaptada de IA – Inseminação Artificial.com.br, 2012.



1- Patologias da Bolsa Escrotal e Testículos (hipoplasia, inflamações, temperatura).

2- Patologias do Epidídimo (hipoplasia e aplasia segmentar, epididimite).

3- Patologia do Prepúcio e Pênis (balanite, postite, desvio e hematomas penianos).

4- Patologias das Glândulas Anexas (cistos, neoplasias, inflamações).

Figura 2: Esquema demonstrativo dos locais em que ocorrem os principais problemas de fertilidade em touros. Fonte: Figura adaptada de Zootecniablogs, 2010.

1.2 Fertilidade, micro-organismos e técnicas de detecção

Como mencionamos anteriormente os micro-organismos são uma causa potencial para a ocorrência de infertilidade, onde eles afetam a fertilidade animal por meio de doenças como a leptospirose, ou por contaminações e infecções de órgãos genitais e sêmen.

Quando se foca no macho bovino percebe-se que a importância da fertilidade do macho é maior que qualquer fêmea, pois o touro pode acasalar com maior número de fêmeas, tanto na monta natural quanto na utilização de Biotécnicas de Reprodução como a inseminação artificial (BARBOSA, 2005). Portanto um macho que se adeque a bons parâmetros de potencial reprodutivo é essencial para produtores, porém devido à interferência de micro-organismos pode haver um comprometimento em seu desempenho reprodutivo. Em machos uma das principais vias de infecção são o plasma seminal que é rico em nutrientes, contendo

aminoácidos, peptídeos, proteínas, lipídeos, ácidos graxos, por este motivo é vulnerável a contaminação e proliferação de micro-organismos (HAFEZ, 2004). A contaminação espermática compromete qualitativamente o esperma deixando o inutilizável. Pois a proliferação descontrolada de patógenos no sêmen leva a diminuição da motilidade espermática, queda do pH do meio (devido ao metabolismo desses micro-organismos contaminadores), aumento na aglutinação, anormalidades de acrossoma e células espermatozoides mortas, dificultando assim a fecundação (GOLDBERG, 2009).

Além de interferência na qualidade do sêmen também há micro-organismos que causam graves quadros de enfermidades que podem utilizar o sêmen como um modo de transmissão. A Brucelose e Leptospirose são duas enfermidades bacterianas com alto risco de transmissão através de sêmen seja durante monta natural ou em casos de utilização de inseminação artificial, responsáveis por altos impactos nos índices reprodutivos do rebanho. A brucelose é causada por bactérias do tipo cocobastonetes gram-negativos do gênero *Brucella*, é responsável por causar sérios prejuízos devido a abortos, retenção de placenta, nascimentos de bezerros inviáveis, metrites. Enquanto que a leptospirose causada por bactérias do gênero *Leptospira*, responsável por perdas reprodutivas através de abortos, mumificações fetais, repetições de cio e bezerros debilitados (FUVERKI, 2010; BARCELOS, 2009). Outro agente infeccioso comumente isolado no sêmen bovino é o herpesvírus bovino tipo 1 (HBV-1). O HBV-1 é membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* causador de varias complicações clínicas, incluindo doenças respiratórias a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), também Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV), Balanopostite Pustular Infecciosa (IBP), e abortos assim como diminuição nos índices de fecundação. HBV-1 replica-se predominantemente na mucosa prepucial e na uretra, contaminando o sêmen durante a ejaculação (ROCHA, 1999; BARCELOS, 2009).

Em propriedades pecuárias a sintomatologia ainda é muita usada para a determinação de quadros de doenças, porém para uma melhor detecção e diagnóstico dos micro-organismos em sêmen existem variadas técnicas descritas em artigos e principalmente usadas em Centrais de Inseminação Artificial, para garantir uma qualidade sanitária do sêmen industrializado. Podemos citar detecção por soroneutralização, imunofluorescência indireta, isolamento de micro-organismos em meio de cultura ou cultivo celular, dentre outros. Porém estas técnicas possuem limitações como infraestrutura necessária para realização, tempo necessário para o procedimento, durante isolamento de patógenos há risco devido à necessidade de manipulação de organismos vivos, a sorologia esta sujeita a falsos-negativos, existem também limitações devido à sensibilidade e especificidade. A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ou reação em

cadeia da polimerase em português, está sendo muito utilizada como uma alternativa para detecção laboratorial de vários micro-organismos e em varias amostras biológicas, como sangue, tecidos, secreções vaginais e sêmen. Foi descrito como método de detecção e diagnóstico para vários agentes infecciosos e doenças diferentes, como a brucelose, leptospirose, herpesvírus e o papilomavírus. O procedimento de detecção utilizando o PCR basicamente baseia-se em utilizar a amplificação específica de uma região do genoma do micro-organismo (FUVERKI, 2010; ROCHA, 1999; BARCELOS, 2009; SILVA, 2008).

Mesmo com todos estes prejuízos ao índice reprodutivo de rebanhos causado por micro-organismos, podemos ressaltar que para os quadros de doenças mais graves como leptospirose, brucelose, e outros, ainda não há indícios de afetar negativamente a capacidade de fertilização do sêmen. Os animais possuem cerca de dez vezes mais células microbianas do que células próprias em seus corpos. Estes micro-organismos conhecidos como Microbiota são importantes, pois fornecem alguma colaboração em processos essenciais do animal, um exemplo é a microbiota intestinal que permite que animais ruminantes consigam digerir celulose de plantas ingeridas (MANDAR, 2012). Portanto deve-se ter em mente que podem existir níveis aceitáveis de presença e que alguns micro-organismos presentes no sêmen podem não causar perda de qualidade espermática grave.

Quando relacionamos a presença de micro-organismos com a influência do tempo e experiências do animal não há dados disponíveis na literatura global. Por este motivo é interessante a realização de estudos que levem a caracterização desta “microbiota” e comparar se a influencia do tempo e experiências em cópulas do animal pode causar alterações nesta microbiota que acarretariam em impactos negativos levando a limitação da fertilidade animal.

2. OBJETIVO

Portanto este trabalho tem como objetivo caracterizar a microbiota presente no sêmen bovino de Novilhos menor de 2 anos virgens e Adultos com aproximadamente 4 anos e experientes.

2.1 Objetivos Específicos

Realizar uma revisão sobre Fertilidade Bovina.

Extrair DNA das amostras de sêmen bovino.

Realizar a amplificação específica do DNA de micro-organismo a partir das amostras obtidas da extração.

Sequenciar o DNA de micro-organismos obtidos a partir da amplificação.

Identificar os micro-organismos presentes nas amostras através de anotação e análise estatística dos dados obtidos do sequenciador.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Coleta de sêmen

Foram utilizados oito touros da raça Hereford, com idades aproximadas de dois anos e quatro anos, classificados como touros virgens e touros adultos experientes. Os animais estavam mantidos em área de campo nativo em pastejo direto, de acordo com o manejo instituído em cada propriedade.

A coleta de sêmen foi procedida pelo Médico Veterinário responsável pelo exame andrológico realizado como rotina. Os ejaculados foram coletados pelo método de massagem nas glândulas anexas. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi mantido em banho-maria (30°C) e submetido à análise macroscópica (volume, aspecto, cor) e microscópica (turbilhão, motilidade progressiva e vigor). Os animais considerados clinicamente saudáveis e aptos à reprodução, após a avaliação do Médico Veterinário, tiveram amostras de sêmen recolhidas e submetidas à congelação e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Proteômica Aplicada (LPA) da Unipampa, Campus de São Gabriel onde permaneceram armazenadas até o momento da extração do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), a relação das amostras analisadas está disponível na Tabela 1.

Tabela 1: Relação de Amostras coletadas.

Ano de Coleta	Touros com 2 anos (Virgens)	Touros com 4 anos (Experientes)
2012	M79	M135
	M63	M39
2013	B109	1172
	B105	993

3.2 Extração de DNA das amostras

3.2.1 *QIAamp DNA mini Kit*

Primeiramente foi preparado 200µl das amostras em tubos de 2 ml, logo em seguida adicionado 1,6ml de Buffer ASL, vortex vigorosamente para homogeneizar a amostra. Foi pipetado 2ml de cada amostra homogeneizada em tubos de 2 ml de microcentrífuga e centrifugado a 14000 RPM por um minuto. Foi então retirado 1,4 ml de sobrenadante e realocado em um novo tubo de 2 ml de microcentrífuga e descartado o pellets. Em seguida foi adicionado meio tablete de *InhibitEX* para cada amostra, vortex vigoroso e contínuo por um minuto até a completa suspensão do tablete. Foi incubado a suspensão por um minuto em temperatura ambiente para permitir a absorção da *Matrix InhibitEX*. Em seguida centrifugado as amostras a 14000 RPM por quatro minutos. Imediatamente após o término da centrifugação foi retirado todo o sobrenadante para novos tubos de microcentrífuga, descartado os pellets, e centrifugado novamente a 14000 RPM por três minutos. Logo foi preparado novos tubos de microcentrífuga contendo 25µl de proteínase K, nestes tubos pipetou-se 600µl de sobrenadante provindos da anterior centrifugação, adicionou-se 600µl de Buffer AL, vortex por quinze segundos e em seguida incubado em 70°C por dez minutos. Foi adicionado logo após incubação 600µl de etanol (96-100%) e misturado por vortex.

Cuidadosamente aplicou-se 600µl do lisado anterior em uma mini coluna *QIAamp*, que está acoplada a um tubo de coleta de 2 ml, foi centrifugado a 14000 RPM por um minuto. Descartou-se o filtrado contido no tubo de coleta, cuidadosamente adicionou-se uma segunda alíquota de 600µl do lisado e então centrifugado novamente por um minuto. Repetiu-se o passo anterior adicionando uma terceira alíquota do lisado na coluna. Após última centrifugação foi descartado o filtrado e adicionado 500µl de Buffer AW1, em seguida centrifugado por um minuto. Proximamente descartou-se o tubo de coleta contendo o filtrado e realocou-se a coluna em um novo tubo de coleta, onde cuidadosamente foi adicionado 500µl de Buffer AW2 e centrifugado por três minutos.

Finalmente foi transferido a coluna *QIAamp* para um novo tubo de coleta 2 ml, cuidadosamente adicionado 200µl de Buffer AE diretamente na membrana da coluna *QIAamp*. Foi incubado por dois minutos em temperatura ambiente e então centrifugado a 14000 RPM por um minuto para eluir o DNA. As amostras foram então armazenadas em gelo até o momento da realização do gel de agarose. Primeiramente foi feito um gel contendo diretamente as amostras logo após eluição, em seguida um segundo gel contendo as mesmas

amostras, porém com a adição de um tratamento com RNase da Ludwig Biotecnologia (Alvorada, Brasil) para uma melhor pureza do DNA obtido.

3.2.2 Genomic DNA Isolation Kit

Inicialmente foi transferido 150µl de todas as amostras em tubos de 1,5 ml cada identificado de acordo com a numeração da amostra, e então se ajustou o volume para 300µl adicionando 150µl de *Digestion Buffer*. Logo em seguida adicionou-se Proteinase K para a suspensão, vortex vagaroso e então incubou-se por uma hora a 55°C. Foi adicionado em seguida 300µl de *Binding Solution*, e então adicionado 300µl de etanol 95% que foi mixado por vortex.

Prepararam-se então tubos de coleta contendo a coluna de ligação, onde aplicamos 600µl da mistura, selaram-se as colunas e foi centrifugado por três minutos a 8.000 RPM. Após centrifugação descartou-se o tubo de coleta com sobrenadante e as colunas foram realocadas em novos tubos de coleta. Repetiu-se este processo até todo o volume da mistura inicial tenha passado pela coluna. Foi então aplicado 500µl de *Wash Solution* nas colunas e centrifugado por um minuto a 14000 RPM, descartado o sobrenadante, adicionado mais 500µl de *Wash Solution* nas colunas e centrifugado novamente por mais dois minutos a 14000 RPM. Realocaram-se então as colunas em novos tubos de coleta de descartou-se os anteriores juntamente o sobrenadante.

Logo em seguida foi feita a eluição do DNA que está ligado na resina da coluna, onde primeiramente foram colocadas as colunas em tubos de eluição de 1,7 ml, adicionado 25µl de *Elution Buffer* (pré-aquecido a 60°C) diretamente no centro da resina, centrifugados por um minuto a 6000 RPM. Após centrifugação adicionou-se mais 25µl de *Elution Buffer* e novamente centrifugados por um minuto a 6000 RPM. Por fim realizou-se uma última centrifugação por dois minutos a 14000 RPM. Os tubos de eluição contendo a o sobrenadante (DNA) foram armazenados em resfriamento em gelo até a realização do gel de agarose.

3.3 Eletroforese em gel de agarose

Para as amostras da primeira extração obtida com o kit QIAGEN preparou-se três géis contendo concentração de 0,8% de Agarose. O primeiro gel continha as amostras M39 e M63 sem tratamento com RNase, foi exposto a uma corrente de 100volts por trinta minutos. O segundo gel continha às amostras restantes M79; M135; B109; 1172; B105 e 993 também sem o tratamento com RNase, exposto a uma corrente de 100volts por uma hora. O terceiro gel continha todas as amostras com um tratamento com RNase, também exposto a uma

corrente de 100vols por uma hora. Enquanto que para as amostras da segunda extração obtida com o kit NORGEN foi preparado um gel com concentração de 0,8% de Agarose, onde foi pipetado todas as amostras obtidas sem um tratamento com RNase, este gel então exposto a uma corrente de 100vols por uma hora.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira metodologia de extração (kit QIAGEN) demonstrou múltiplas bandas quando observamos o primeiro gel contendo apenas as amostras M39 e M63 sem tratamento com RNase (Figura 3A), enquanto as demais amostras M79; M135; B109; 1172; B105 e 993 também sem RNase apresentaram banda em forma de um arraste no segundo gel (Figura 3B).

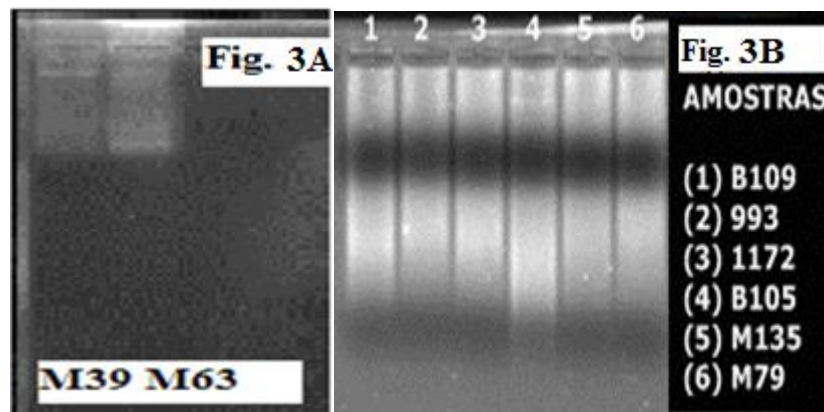


Figura 3: Gél de Agarose 0,8% demonstrando presença de DNA da primeira metodologia de extração. A: gel contendo amostras M39 e M63 sem tratamento RNase, exposto a corrente de 100vols por trinta minutos. B: gel contendo as M79; M135; B109; 1172; B105 e 993 também sem RNase, exposto a corrente de 100vols por uma hora.

Já quando observamos o terceiro gel contendo todas as amostras com um tratamento com RNase notamos o desaparecimento das bandas, ou uma alta diminuição da intensidade do arraste nas colunas (Figura 4). Esperávamos uma diminuição na intensidade das bandas devido à degradação do RNA presente nas amostras, porém o total desaparecimento de bandas demonstrou que possivelmente em algum passo do procedimento ocorreu um erro que levou a degradação do DNA. Portanto foi necessária a utilização de um novo protocolo de extração, para obter resultados mais coerentes. Realizamos então a segunda metodologia de extração (kit NORGEN), notamos também o desaparecimento de arrastes nas colunas 1, 2 e 3. e arraste nas demais colunas, porém com uma pequena intensidade. Utilizamos todas as amostras M39; M63; M79; M135; B109; 1172; B105 e 993 sem um tratamento com RNase (Figura 5).

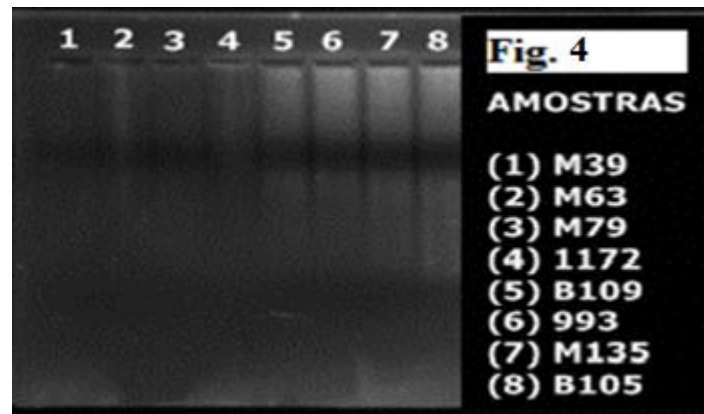


Figura 4: Gél de Agarose 0,8% demonstrando presença de DNA da primeira metodologia de extração. Gel contendo as amostras M39; M63; M79; M135; B109; 1172; B105 e 993 que passaram por tratamento com RNase, exposto a corrente de 100vols por uma hora.

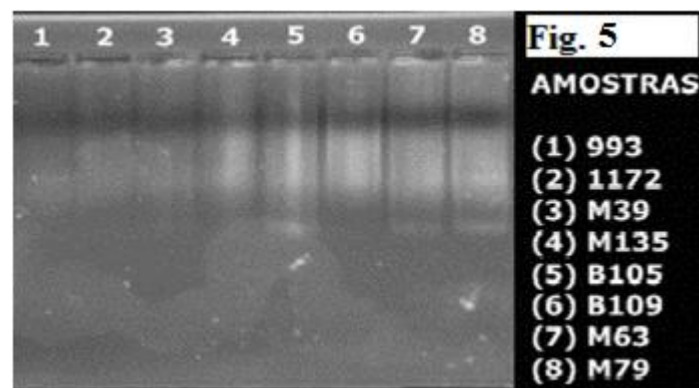


Figura 5: Gél de Agarose 0,8% demonstrando presença de DNA da segunda metodologia de extração. Gel contendo as amostras M39; M63; M79; M135; B109; 1172; B105 e 993 que não passaram por tratamento com RNase, exposto a corrente de 100vols por uma hora.

O DNA de fita dupla é estável e resistente a condições adversas, porém também é vulnerável a forças leves originadas durante pipetagem ou agitação, também durante a sua manipulação pode ocorrer contaminações, e até mesmo a condição da amostra a ser extraída deve ser observada, pois amostras não frescas ou não conservadas devidamente levam a degradação do DNA devido à nucleases endógenas (SCHAEFER, 2006). Quando observamos estes resultados inconsistentes supomos que provavelmente tivemos algum problema durante o procedimento que levou a degradação de DNA, uma possível contaminação ou quebra do DNA por má manipulação. Pela falta de resultados concisos durante a extração de DNA ficamos impossibilitados de seguir adiante com os experimentos que eram almejados.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Concluimos que as metodologias de extração de DNA testadas não foram eficientes devido à falta de reprodutibilidade, novos experimentos deverão ser realizados para uma melhor extração e o prosseguimento do trabalho.

Temos como perspectivas futuras definir uma metodologia de extração eficiente e com reprodutibilidade. Em seguida realizaremos uma técnica de PCR, onde teremos como alvo de replicação as fitas de DNA que contenham sítios de ligação a *primers* específicos de bactérias, mais especificamente, a região 16S do Ribossomo bacteriano. A partir desta amplificação por PCR, iremos então sequenciar as fitas específicas geradas utilizando o equipamento Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), é um equipamento de sequenciamento de última geração. A utilização de sequenciamento com este equipamento já vem sendo descrita com resultados satisfatórios para trabalhos acadêmicos, principalmente em estudos de microbiomas do rúmen de animais ruminantes. O DNA obtido a partir da amplificação por PCR será submetido a uma fragmentação e em seguida utilizaremos *ligate adapters* nos fragmentos para a preparação da biblioteca de sequências, escolheremos o tamanho de fragmento adequado através de uma revelação em gel de agarose, com o tamanho de fragmentos padronizado iremos então colocar no Ion micro-chip, que então será colocado no equipamento Ion Torrent PGM por certa quantidade de ciclos (LOPES, L. D., 2013). As sequências geradas pelo Ion Torrent PGM serão então submetidas a um processamento de dados, anotação e análise estatística para por fim ter a identificação dos micro-organismos presentes nas amostras de sêmen coletadas.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, R. T.; et al. **A importância do exame Andrológico em Bovinos**. Embrapa, Circular Técnica 41, Dezembro 2005.

BARCELOS, V. B., et al. **Agentes Infeciosos no Sêmen de Touros**. NUPEEC Nucleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária, UFPEL, Pelotas, 2009.

BICUDO, S. D.; et al. **Patologias do Sistema Reprodutor de Touros**. 20 RAIB, Biológico, São Paulo, v.69, n.2, p.43-48, Julho\Dezembro 2007.

FUVERKI, R. B. N. **Padronização de um Protocolo para Detecção Molecular de *Leptospira spp.* e *Brucella spp.* em Sêmen Bovino Comercial**. Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2010.

GOLDBERG, A. M. G. **Fatores de Risco para a Contaminação Bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas consequências sobre a qualidade das Doses Inseminantes**. Fevereiro 2009, p.44, Dissertação apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

GONÇALVES, M. V. L. **Causas da Infertilidade na vaca leiteira e Hormônios relacionados com a Reprodução**. Novembro 2005, p.108, Trabalho apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2005.

HAFEZ, E. S. E. HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Manole, Sétima Edição Brasileira, cap. 7, p. 107-108, São Paulo, 2004.

IA – Inseminação Artificial. **Manejo Reprodutivo**. Disponível em <http://www.inseminacaoartificial.com.br/Manejo_reprodutivo.htm> Acesso em 25 de Agosto de 2014.

LOPES, L. D. **Sequenciamento do Microbioma do Rúmen de Ovinos utilizando a Plataforma Ion Torrent (PGM)**. Dissertação apresentada a Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

LUCENA, G. M. A. **Tendências na Evolução da Fertilidade em Explorações de Bovinos Leiteiros em Gloucestershire**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Universidade Técnica de Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária, 66 f. Lisboa, 2008.

MANDAR R. **Microbiota of Male Genital Tract: Impact on the Health of man and his patner**. Pharmacological Research, Elsevier, v.69, p.32-41, 2012.

MUKASA-MUGERWA, E. **A Review of Reproductive Performance of female *Bos indicus* (Zebu) cattle**. Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5442e/x5442e00.htm#Contents>> Acesso em 18 de Julho de 2014.

ROCHA, M. A.; et al. **Herpesvírus Bovino Tipo 1 no Sêmen**. Ciência Rural, Santa Maria, v.29, n.2, p. 373-380, 1999.

SILVA, M. A. R. **Avaliação da Presença de Papilomavírus Bovino em Sêmen de Touros (*Bos taurus*) em Pernambuco**. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2008.

SCHAEFER, R. **Técnicas em Biologia Molecular**. Embrapa. Documentos 116, Dezembro 2006.

VALLE, E. R.; et al. **Estratégias para Aumento da Eficiência Reprodutiva e Produtiva em Bovinos de Corte**. Embrapa, Documento 71, Campo Grande, 1998.