



Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal

Polymerase Chain Reaction application in animal reproduction

A.N. Melo¹, E.R. Santos Júnior², M. Adrião³, A. Wischral^{4,5}

¹Agência Goiana de Defesa Agropecuária, Goiânia GO, Brasil.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada PE, Brasil.

³Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁵Correspondência: aurea@dmv.ufrpe.br

Resumo

As doenças da reprodução possuem peso importante nos índices de natalidade e de natimortos, na taxa de prenhez e no retorno ao cio, causando inúmeros prejuízos. Com o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase na medicina veterinária, é possível reduzir essas perdas por meio do diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, além de esta ser uma tecnologia capaz de viabilizar procedimentos como identificação do sexo embrionário e investigação de paternidade. Este trabalho traz uma revisão de literatura sobre a aplicação desta ferramenta molecular na reprodução animal, abordando sua utilização como suporte a novas biotecnologias, na detecção de diversas doenças e no aumento da eficiência reprodutiva animal.

Palavras-chave: doenças, identificação do sexo, paternidade.

Abstract

The reproductive diseases have significant importance in the birth rate, rate of pregnant, return to estrus and stillbirths, causing numerous losses. With the development of polymerase chain reaction in veterinary medicine, it is possible to reduce these losses by the diagnosis of genetic diseases and infectious diseases, in addition to being a technology capable of viabilize procedures for identification of embryonic sex and paternity. This study brings a revision above the application of this molecular tool on Animal Reproduction, approach its utilization like a support the new biotechnologies, to detection of patologies and to improve the efficiency of animal reproduction.

Keywords: *diagnostic diseases, paternity, sexing.*

Introdução

Dentre as novas tecnologias, a aplicação da análise de DNA tem se intensificado bastante nos últimos anos, e o desenvolvimento do método de reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) tem sido largamente empregado nas áreas biológicas, em especial na medicina veterinária. A utilização desta técnica é tão ampla que podem ser editados compêndios sobre a metodologia de PCR em cada especialidade diagnóstica (Oliveira, 2003).

Particularmente na microbiologia, a atuação da biologia molecular é muito ampla, apesar de ser mais usada na pesquisa e no ensino. Porém, muitas doenças infecciosas dependem de um diagnóstico rápido e seguro, que, com certeza, encontram solução na PCR (Oliveira, 2003).

As técnicas moleculares têm sido um grande avanço para a bacteriologia, particularmente para o diagnóstico das micoplasmoses, pois, além de detectarem estirpes inviáveis para o isolamento, requerem pequenas quantidades de DNA presentes na amostra clínica a ser analisada (Andrade, 1993; Farah, 1997; Ghadersohi et al., 1997). A possibilidade da amplificação de um gene específico, como os genes de uma bactéria, por meio da PCR, poderá vir a dispensar os métodos diagnósticos clássicos até então utilizados (Farah, 1997).

Na reprodução animal, a PCR oferece a possibilidade de identificar o sexo de embriões (Almeida e Alvarez, 2003), porém, para ser comercialmente viável, a técnica de sexagem deve ser reproduzível, barata e rápida o suficiente para permitir avaliar um grande número de embriões em pouco tempo (Van Vliet et al., 1989). Por enquanto, apenas a técnica da PCR parece cumprir as condições acima assinaladas, estando credenciada para ser utilizada na sexagem de embriões de alto valor genético (Almeida e Alvarez, 2003).

Esta técnica também vem sendo bastante utilizada em diversos segmentos diretamente ligados à reprodução. A presente revisão objetiva apresentar as principais aplicações da técnica de PCR para desenvolver o manejo e a sanidade da reprodução de animais domésticos.



Reação em cadeia da polimerase

A PCR é um método utilizado para amplificar uma sequência selecionada de DNA ou RNA, a qual permite sintetizar, em poucas horas, milhões de cópias de uma sequência de nucleotídeos específica, podendo amplificar a sequência-alvo em um milhão de vezes da amostra inicial (Champe e Harvey, 1997). Como consequência do desenvolvimento desta tecnologia, é atualmente possível realizar diversos tipos de diagnósticos, entre eles a investigação de paternidade, a detecção de doenças genéticas e infecciosas, além da determinação do sexo de embriões (Garcia et al., 2003).

PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real (qPCR) é baseada na PCR tradicional, todavia, além de amplificar, simultaneamente, ela determina medidas quantitativas ao longo dos ciclos da PCR, tornando-se uma ferramenta mais rápida, específica e sensível, dando a capacidade de quantificar o DNA durante as reações (Schmittgen, 2000).

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, já que determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (CT). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência (Novais e Pires-Alves, 2004).

Identificação de microrganismos

A presença de microrganismos causadores de doenças infecciosas pode atingir diretamente a produtividade (Cardoso et al., 2000) em bovinos. Brucelose, leptospirose, campilobacteriose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e tricomoníase estão entre as mais frequentemente associadas a distúrbios reprodutivos (Kirkbride, 1987; Eaglesome et al., 1992).

Ao lado destas doenças, várias outras, menos conhecidas e, conseqüentemente, pouco divulgadas, como as micoplasmoses, deveriam ser investigadas, pois resultam em quadro sintomatológico semelhante àquelas citadas acima, além de constar da lista B da Organização Internacional de Epizootias (OIE) como doenças suscetíveis de serem transmitidas pela inseminação artificial (Thibier e Guerin, 2000).

Doenças causadas por bactérias

Micoplasmose

Mycoplasma bovis, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* ocorrem predominantemente na cavidade oral, nos tratos respiratório e urogenital de várias espécies animais e de humanos (Cardoso et al., 2006). Estes agentes estão comprovadamente envolvidos em casos de vesiculite seminal, balanopostite, epididimite (Pilaszek e Truscynski, 1988) e outras patologias responsáveis por alterações morfológicas e funcionais dos espermatozoides (Panangala et al., 1981; Eaglesome et al., 1992), como diminuição da motilidade, a qual resulta em baixa qualidade do sêmen (Doig et al., 1981; Hall e McEntee, 1981; Fish et al., 1985; Huffman et al., 1985; Jasper, 1987; Rae et al., 1995).

O diagnóstico da micoplasmose pela PCR combina o *primer* MGSO selecionado a partir da região 16S rRNA com o oligonucleotídeo procariótico GPO-1, que amplifica um fragmento de 715 pares de bases, o qual está presente em todos os organismos da classe Mollicutes (Kuppeveld et al., 1992).

Em trabalho realizado por Cardoso et al. (2006) visando reduzir o tempo para os resultados laboratoriais e melhorar os níveis de detecção dos agentes, *primers* espécie-específicos para *M. bovigenitalium* e *U. diversum* foram utilizados com a intenção de ser testada sua eficiência em um processo de triagem das amostras clínicas. A PCR para *M. bovigenitalium* apresentou excelente nível de detecção em muco prepucial e em sêmen, justificando a necessidade do diagnóstico desta espécie em reprodutores, especialmente em amostras de sêmen, que deveriam estar livres de qualquer contaminação.

Rizzo et al. (2011) obtiveram sucesso no isolamento e na detecção de micoplasma e ureaplasma em material clínico do trato reprodutivo de fêmeas da espécie caprina, utilizando *primers* genéricos, que identificam qualquer membro da classe Mollicutes (micoplasma, acholeplasma, ureaplasma e espiroplasma) também a partir da região 16S rRNA, constatando associação entre as bactérias e os distúrbios reprodutivos. Por meio da PCR, estes pesquisadores detectaram ainda micoplasmas anteriormente descritos como espécie-específicos, envolvidos em infecções de hospedeiros não específicos.



Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose bacteriana prevalente em todo o mundo. É causada por espiroquetas da espécie *Leptospira interrogans*, que apresentam mais de 212 sorovares, agrupados em 23 sorogrupos (Ellis, 1994). Em bovinos, o sorovar *hardjo* é o mais importante porque compromete o desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos, causando abortamento, natimortalidade e nascimento de bezerras fracas (Ellis, 1994).

Este agente pode afetar animais domésticos, selvagens e humanos, representando, portanto, um importante problema de saúde pública (Barwick et al., 1997). A infecção ocorre diretamente através da pele e mucosas, que entram em contato com urina, fluidos placentários, leite ou água e alimentos contaminados, podendo também ser transmitida pelo sêmen e por via transplacentária (Bolin e Prescott, 1999). A detecção de *Leptospira* no sêmen equino já foi descrita no Brasil (Scarcelli et al., 2001).

A infecção por *Leptospira* sp. em equinos é considerada como uma causa importante de abortos (usualmente ao 6º mês de gestação), nascimento de animais fracos ou prematuros, natimortos e mortalidade neonatal (Hong et al., 1993).

Amostras de urina e rim de primata foram submetidas às técnicas de cultivo e inoculação experimental em cobaias e à técnica da PCR empregando-se *primers* gênero específicos da sequência do gene 16S rRNA de *Leptospira interrogans* sorotipo canicola. Na PCR, as amostras clínicas revelaram um fragmento amplificado de 330 pb correspondente ao gênero *Leptospira*, enquanto nas demais técnicas empregadas (cultivo e inoculação experimental em cobaias) o isolamento do agente foi negativo (Scarcelli et al., 2001).

A técnica de PCR representa um importante método de detecção para o diagnóstico da leptospirose em primatas, considerando-se que não é necessária a viabilidade do patógeno, permitindo a detecção do agente em amostras autolisadas, congeladas ou amostras malconservadas (Scarcelli et al., 2001).

Brucelose

A brucelose é uma doença infectocontagiosa crônica, comum a diversas espécies animais. É uma das doenças ou infecções, naturalmente transmissíveis entre os animais e o homem, mais amplamente difundidas por todo o mundo (Vasconcellos et al., 1987). Afeta a população humana em muitos países em desenvolvimento, incluindo os do Oriente Médio e da América Latina, onde ainda é endêmica (Nimri, 2003), sendo que quatro espécies podem causar infecção em humanos: *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. suis* e especialmente *B. melitensis* (Young, 1995).

O agente etiológico da brucelose ovina é *Brucella ovis*, que produz doença crônica em ovinos caracterizada por epididimite e subsequente diminuição de fertilidade em carneiros; em ovelhas, causa abortos ocasionais (Nozaki et al., 2004).

A automatização da PCR tornou esta técnica muito promissora para identificação de DNA de bactérias (Saiki et al., 1988), sendo capaz de detectar DNA de *Brucella* spp. (Baily et al., 1992; Fekete et al., 1992; Herman e Ridder, 1992).

Um teste para diagnosticar a *Brucella* spp. em bovinos foi desenvolvido usando-se o gene 43-kDa da membrana externa da *B. abortus* como um alvo para o PCR (Fekete et al., 1990). Em razão de os métodos de diagnósticos que usam sequências do rRNA como alvo apresentarem alta confiança para tipos diferentes das amostras, foram utilizados dois *primers* para o 16S rRNA da *B. abortus* na PCR em trabalho realizado por Herman e Ridder (1992).

Em rebanhos bovinos com histórico de brucelose, o cão pode ser considerado como possível fonte de infecção por *B. abortus*, como descrito por Megid et al. (2007), após sintomatologia clínica, sorologia persistente e presença do DNA bacteriano em urina e sangue nesta espécie detectado por PCR, a partir do gene que codifica uma proteína imunogênica de 31kDa de *B. abortus*.

Campilobacteriose

A campilobacteriose genital bovina (CGB), causada pelo *Campylobacter fetus*, é uma enfermidade de transmissão venérea que afeta bovinos, caracterizada principalmente por infertilidade (Catena, 2003). Devido aos longos intervalos entre partos e à diminuição do número de terneiros produzidos, ocasiona baixa eficiência reprodutiva, o que leva a perdas econômicas significativas e afeta a produtividade da pecuária leiteira e de corte (Cobo et al., 2003).

Nas fêmeas bovinas, o *C. fetus* coloniza o trato genital e produz infertilidade temporária, ciclos estrais irregulares, morte embrionária e abortamento. Os touros são portadores e principais disseminadores da doença; nesses animais, a bactéria está confinada à mucosa do pênis, ao prepúcio e à porção distal da uretra (Eaglesome e Garcia, 1992).

A PCR é uma grande aliada na identificação de bactérias cujo isolamento e classificação são problemáticos. Uma das principais vantagens desta técnica é que ela não necessita de grandes cuidados na colheita e no transporte das amostras, uma vez que o DNA bacteriano permanece íntegro, mesmo que o agente



esteja inviável.

A especificidade, sensibilidade, praticidade e rapidez em relação à cultura de *C. fetus* tornam a PCR uma alternativa mais eficiente para o diagnóstico da campilobacteriose genital bovina, permitindo, assim, uma melhor estimativa da prevalência desta enfermidade em rebanhos, para a adoção de medidas de controle, visando aumentar a produtividade deles (Groff e Vargas, 2005).

Doenças causadas por vírus

Balanopostite pustulari Infecçiosa e rinotraqueíte infecciosa bovina

O BHV-1 é o agente causal da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), da vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e da balanopostite pustular infecciosa (IBP). É considerado o principal patógeno viral encontrado no sêmen bovino, fazendo com que os esforços realizados para sua detecção neste substrato sejam crescentes (Afshar e Eaglesome, 1990).

A detecção do ácido nucleico viral por meio da PCR tem se mostrado como uma alternativa rápida e sensível ao isolamento viral (Meyer et al., 2003). Vários protocolos para a detecção do BHV-1, em amostras de sêmen bovino, foram desenvolvidos utilizando-se diversos tipos de preparo da amostra, técnicas de extração do DNA viral e *primers* direcionados para diferentes regiões-alvo, apresentando praticidade e desempenho bastante variados (Meyer et al., 2003).

Doenças causadas por protozoários

Tricomoniase

Tricomonose bovina é uma doença sexualmente transmissível e infecciosa, causada pelo protozoário *Tritrichomonas foetus*, caracterizada principalmente por alterações reprodutivas nas fêmeas, tais como: morte embrionária inicial, aborto, piometra ou maceração fetal, enquanto nos machos a infecção é assintomática (tricomoniase), podendo permanecer infectado e fonte de infecção durante sua vida reprodutiva (Gomes, 2008).

Ho et al. (1994) desenvolveram uma sonda de DNA específica com o objetivo de melhorar o diagnóstico do *T. foetus* aplicado em amostras no meio de cultivo, do material uterino e do esmegma prepucial. Uma sequência de 0.85 kb é considerada a melhor sonda, tendo como base a especificidade. Para aumentar a sensibilidade, foi utilizada uma sequência parcial da sonda a fim de identificar dois *primers* (TF1 e TF2) que podem ser utilizados para ampliar o DNA específico do parasito. O DNA é extraído utilizando-se o *kit* de extração, o qual é rápido, fácil e reproduzível, permitindo a detecção de um único parasito em cultivo ou 10 organismos em amostra de esmegma.

A presença de inibidores da Taq e da polimerase no esmegma bovino diminui a sensibilidade quando comparado ao meio de cultivo, mas oferece a vantagem de ser de fácil desempenho, rápida detecção (1 dia) e aumento de amostras trabalhadas.

Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose, é um protozoário de ciclo de vida facultativamente heteroxeno (os parasitas se desenvolvem em pelo menos dois hospedeiros, definidos como hospedeiros intermediários e definitivos) e infecta todas as espécies de animais homeotérmicos, incluindo mamíferos, aves e o homem (Silva et al., 2003). A infecção pelo *T. gondii* é associada à ocorrência de morte embrionária e reabsorção, morte fetal e mumificação, abortos, natimortos e mortalidade neonatal (Dubey, 2009).

Moraes et al. (2010) utilizaram PCR, entre outras ferramentas, para caracterizar os distúrbios reprodutivos nas fases aguda e crônica em ovinos infectados experimentalmente com diferentes doses de *Toxoplasma gondii* durante a inseminação artificial e obtiveram excelentes resultados na amplificação de produto com 197 pb correspondente a *T. gondii*.

Biotecnologias

Sexagem embrionária

O desenvolvimento de metodologias que permitam a predeterminação do sexo dos embriões tem sido objeto de inúmeras equipes de investigação em todo o mundo. Diversos métodos foram implementados. No entanto, apenas a detecção de sequências de DNA específicas do cromossoma Y, após recolha de biópsia embrionária e amplificação pela PCR, é suficientemente rápida e eficaz para ser usada na prática, como demonstraram Bredbacka (2001), Lopes et al. (2001), Lopes da Costa et al. (2002) e Pereira et al. (2007) ao trabalharem com embriões bovinos.



Nas espécies caprina e ovina, Santos Junior et al. (2011) obtiveram resultados satisfatórios na sexagem em animais adultos com diferentes protocolos de PCR multiplex em pequenas quantidades de DNA para os genes SRY, Aml-X e regiões ZFX/ZFY, projetando esta técnica para pequenas amostras, como biópsias embrionárias e espermatozoides.

Sexagem de espermatozoides

Até o momento, as técnicas que se baseiam na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozoides X e Y são as únicas validadas cientificamente (Garner, 2006). Uma dessas técnicas é a citometria de fluxo, em que se utiliza um equipamento munido de um *laser*, o qual é capaz de separar as duas populações de espermatozoides com uma acuidade de mais de 90%. Por meio de uma metodologia bem mais simples, a centrifugação em gradiente de densidade é capaz de separar os espermatozoides X dos Y a um custo e a uma demanda de tempo bem menores, apesar de uma acuidade menor (ao redor de 70%) à obtida na citometria de fluxo (Hossepián de Lima et al., 2000, 2007).

Para verificar a ocorrência de danos aos espermatozoides que podem ocorrer durante a centrifugação, podem ser realizados testes *in vivo*, como a utilização desses espermatozoides na inseminação artificial, ou testes *in vitro*, como, por exemplo, por meio de técnicas de coloração, taxa de clivagem e de blastocisto durante a produção *in vitro* de embriões (Resende et al., 2009). Resende et al. (2010) avaliaram também o desvio da proporção de sexo em espermatozoides bovinos e a viabilidade espermática pela determinação de fragmentação do DNA após a centrifugação em gradiente de densidade contínuo.

Por ser uma técnica que possui alta especificidade e sensibilidade, a PCR é sempre utilizada para validação de qualquer um destes procedimentos, tornando-se uma ferramenta indispensável na técnica de sexagem de espermatozoides.

Paternidade

O teste de progênie tem por função identificar animais geneticamente superiores que futuramente poderão ser utilizados com o objetivo de promover o melhoramento da raça (Baron, 2000).

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores genéticos, da tecnologia do DNA recombinante e da amplificação de segmentos de DNA pela PCR abriu caminho para a análise genética direta da sequência de DNA, bem como para o desenvolvimento de outros métodos de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismos (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Por aproximadamente três décadas, cavalos registrados têm sido submetidos ao teste de paternidade utilizando-se tipagem sanguínea. Como alternativa para casos não resolvidos, esta metodologia está sendo substituída pela PCR, que possui vantagens como requerer pequena quantidade de material biológico e não fazer restrição ao tipo de tecido, podendo ser utilizados sangue, sêmen congelado, tecidos degradados, pelos, ossos e dentes (Baron, 2000).

Para a investigação de paternidade em bovinos da raça Gir, Baron (2000) utilizou os marcadores microssatélites BM8246, BMS963, BMS483, TEXAN15, INRA112 na concentração 4 μ m e CSFM50 na concentração 0,2 μ m, obtendo excelentes resultados.

Considerações finais

Nos últimos 20 anos, a técnica de PCR tem crescido bastante e seu uso tem se estendido por diversas áreas na medicina veterinária, podendo ser atualmente utilizada para diagnóstico de várias doenças causadas por bactérias (leptospirose, campilobacteriose, micoplasmose, brucelose) ou vírus (detecção do BHV-1), como também no suporte à implantação de várias biotecnologias novas, como a sexagem de embrião e o teste de paternidade.

A biossegurança também constitui uma grande vantagem da PCR, já que não necessita da realização de inoculação e cultura de microrganismos, como nos métodos clássicos utilizados em diversos laboratórios.

Esta técnica tem se constituído em uma ferramenta de alta confiabilidade para o desenvolvimento do manejo e da sanidade da reprodução de animais domésticos, promovendo o aumento de produção e lucratividade, além de saúde e bem-estar animal.

Referências

- Afshar A, Eaglesome MD.** Viruses associated with bovine semen. *Vet. Bull.*, v.60, n.2, p.93-109, 1990.
- Almeida GP, Alvarez RH.** Métodos de determinação do sexo de embriões bovinos. *Bol Ind Anim*, v.60, p.185-196, 2003.
- Andrade LEC.** Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. *Rev Assoc Med Bras*, v.39, p.175-86, 1993.



- Baily GG, Krahn JB, Drasar BB, Stoker NG.** Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, v.95. p.271-275, 1992.
- Baron EE.** Investigação de paternidade e seus efeitos no melhoramento de bovinos da raça Gir Leiteiro. 2000. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2000.
- Barwick RS, Mohammed HO, McDonough PL, White ME.** Risk factors associated with the likelihood of Leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. *Am J Vet Res*, v.58, p.1097-1103, 1997.
- Bolin CA, Prescott JF.** Leptospirosis. In: Howard JL, Smith RA. (Ed.). *Current veterinary therapy*. 4.ed. Philadelphia : Saunders, 1999. v.1, p.352-357.
- Bredbacka P.** Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology*, v.55, p.23-34, 2001.
- Cardoso MV, Blanchard A, Ferris S, Verlengia R, Timenetsky J, Cunha RAF.** Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR based detection assay. *Vet Microbiol*, v.72, p.241-250, 2000.
- Cardoso MV, Teixeira SR, Miyashiro S, Vasconcellos SA, Gregory L, Genovez LE.** Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e central de inseminação artificial. *Arq Inst Biol São Paulo*, v.73, p.33-40, 2006.
- Catena M.** Efectos de la infección experimental con *Campylobacter fetus venerealis* sobre la preñez temprana en vaquillonas. *InVet*, v.5, p.37-44, 2003.
- Champe PC, Harvey RA.** *Bioquímica ilustrada*. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 446p.
- Cobo ER, Cipolla AL, Morsella CG, Cano DA, Campero CM.** Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. *J Vet Med Ser B*, v.50, p.75-80, 2003.
- Doig PA, Mackay AL, Ruhnke HL.** *Ureaplasma* (T strain mycoplasma) infection in the bovine reproductive tract. *Proc Am Assoc Bovine Practit*, v.13, p.127-136, 1981.
- Dubey JP.** Toxoplasmosis in sheep - the last 20 years. *Vet Parasitol*, v.163, p.1-14, 2009.
- Eaglesome MD, Garcia MM.** Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet Bull*, v.62, p. 743-775, 1992.
- Eaglesome MD, Garcia MM, Stewart RB.** Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* spp. And *Ureaplasma* spp., Chlamydia; Pathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. *Vet Bull*, v.62, p.887-910, 1992.
- Ellis WA.** Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am*, v.10, p.463-478, 1994.
- Farah SB.** DNA segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier, 1997. 276p.
- Fekete AJ, Bantle A, Halling SM.** Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J Vet Diagn Invest*, v.4 p.79-83, 1992.
- Fekete A, Bantle JA, Hailing MS, Sanborn MR.** Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*, v.69, p.216-227, 1990.
- Ferreira ME, Grattaplagia D.** Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2.ed. Brasília: Embrapa, CENARGEM, 1996. 220 p.
- Fish NA, Rosendal S, Miller RB.** The distribution of *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* in the genital tract of normal artificial insemination bulls. *Can Vet J*, v.26, p.13-15, 1985.
- Garcia JF, Avelar GA, Dias FEF.** Aplicação de tecnologias de análise genética no diagnóstico em Medicina Veterinária. In: Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, 5, 2003, Recife, PE. Anais... Recife: SPMV, 2003. p.100-103.
- Garner DL.** Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, v.65, p.943-957, 2006.
- Ghadersohi A, Coelen RJ, Hirst RG.** Development of specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol*, v.56, p.87-98, 1997.
- Gomes MJP.** *Tritrichomonas foetus*. 2008. Apostila (Disciplina Microbiologia Clínica) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.
- Groff ACM, Vargas AC.** Padronização da técnica da PCR para o diagnóstico da campilobacteriose genital bovina. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2005.
- Hall CE, Mcentee K.** Reduced post-thawing survival of sperm in bull with Mycoplasma vesiculitis (Brief communication). *Cornell Vet*, v.71, p.111-112, 1981.
- Herman R, Ridder H.** Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, v.58, p.2099-2101, 1992.
- Ho MSY, Conrad PA, Conrad PJ, Lefebvre RB, Perez B, BonDurant RH.** The detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *J Clin Microbiol*, v.32, p.98-104, 1994.
- Hong CB, Donahue JM, Giles RC JR, Petrites-Murphy MB, Poonacha KB, Roberts AW, Smith BJ, Tramontin RR, Tuttle PA, Swerczek TW.** Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 following seasons. *J Vet Diagn Invest*, v.5, p.560-566, 1993.



- Hossepian de Lima VFM.** Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. *Rev Bras Zootec*, v.36, p.219-228, 2007.
- Hossepian de Lima VFM, Ramalho MDT, Rodrigues LH, Malheiros EB, Moreira Filho CA.** Separation of X- and Ybearing bovine spermatozoa by percoll density gradient centrifugation. *Theriogenology*, v.53, p.280, 2000. Abstract.
- Huffman EM, Christensen V, Hird D, Jasper D.** Epidemiology of bovine genital ureaplasma infection. *Proc Soc Theriogenol*, p.67-71, 1985.
- Jasper DE.** Bovine mastitis due to mycoplasma. *Rev Sci Tech*, v.6, p.801-807, 1987.
- Kirkbride CA.** Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v.3, p.575-591, 1987.
- Kuppeveld FJM, Logt JTM, Angulo AF, Zoest MJ, Quint WGV, Niesters HGM, Galama JMD, Melchers WJG.** Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16 rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*, v.58, p.2606-2615, 1992.
- Lopes RFF, Forell F, Oliveira ATD.** Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, v.56, p.1383-1392, 2001.
- Lopes da Costa L, Chagas e Silva J, Diniz P, Cidadão R.** Preliminary report on sexing bovine pré-implantation embryos under the conditions of Portugal. *Rev Port Cienc Vet*, v.97, p.95-98, 2002.
- Megid J, Salgado VR, Keid LB, Siqueira AK, Meirelles CE, Moretti DM.** Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, n.6, 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000600036&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 abr 2012.
- Meyer AD, Cortez A, Soares RM, Pituco ME, Okuda L, Leomil H, Castro AMMG, Richtzenhain LJ.** Comparação das técnicas de isolamento viral e nested PCR na detecção do BHV-1 em sêmen bovino experimentalmente e naturalmente contaminado. *Arq Inst Biol São Paulo*, v.70, p.123-126, 2003.
- Moraes EP, Freitas AC, Gomes-Filho NA, Guerra MM, Silva MA, Pereira MF, Braga VA, Mota RA.** Characterization of reproductive disorders in ewes given an intrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.36-41, 2010.
- Nimri LF.** Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. *BMC Infect Dis*, v.3, n.5, 2003.
- Novais CM, Pires-Alves M.** PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Biotec Ciênc Desenv*, v.7, n.33, p.10-13, 2004.
- Nozaki CN, Megid J, Lima KC, Silva Junior FF, Veloso CS.** Comparação das técnicas de imunodifusão em gel de ágar e Elisa no diagnóstico de brucelose ovina em cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo. *Arq Inst Biol São Paulo*, v.71, p.1-5, 2004.
- Oliveira CJR.** Aplicações teóricas da biologia molecular/engenharia genética em análises clínicas. 2003. Apostila (Disciplina Engenharia Genética) - Curso de Biomedicina, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Metodista, São Paulo, 2003. p.17-20.
- Panangala VS, Winter AJ, Wijesinha A, Foote RH.** Decreased motility of bull spermatozoa caused by *Mycoplasma bovis*. *Am J Vet Res*, v.42, p.2090-2093, 1981.
- Pereira, RMLN, Carvalhais I, Pimenta J, Marques CC, Baptista MC, Vasques MI, Horta AEM, Santos IC, Marques MR.** Sexagem de embriões bovinos: eficiência e precisão, distribuição do sexo e viabilidade após vitrificação. *Rev Port Cienc Vet*, v.102, p.103-117, 2007.
- Pilazec J, Truscynski M.** Affinity of microorganisms of the genus *Ureaplasma* to the reproductive organs of cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.11, p.177-180, 1988.
- Rae DO, Chenoweth PJ, Brown MB.** Ureaplasma infection in the bovine. *Arch STD/HIV Res*, v.7, p.239-243, 1995.
- Resende MV, Bezerra MB, Perecin F, Almeida AO, Lúcio AC, Hossepian de Lima VFM.** Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll and OptiPrep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. *Ciênc Anim Bras*, v.10, p.581-587, 2009.
- Resende MV, Lúcio AC, Perecin F, Oliveira LV, Almeida AO, Gusmão AL, Hossepian de Lima VFM.** Desvio da proporção de sexo e integridade do DNA dos espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.11, p.260-269, 2010.
- Rizzo H, Meira Junior EBS, Oliveira RC, Yamaguti M, Buzinhani M, Timenetsky J, Gregory L.** Isolamento e PCR para detecção de *Mollicutes* em muco vaginal e sua associação com problemas reprodutivos em ovinos criados na região de Piedade, São Paulo, Brasil. *Ciênc Rural*, v.41, n. 2, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782011000200024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 abr 2012.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, p.487-491, 1988.
- Santos Junior ER, Melo AN, Wischral A, Adriaio M, Holanda GML.** Identificação do sexo em caprinos e ovinos com quantidade reduzida de DNA. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.352-356, 2011.



Scarcelli E, Genovez ME, Piatti RM, Girio RJS, Cardoso MV, Miyashiro S, Castro V. Detecção de *Leptospira* spp. em sêmen equino pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Arq Inst Biol São Paulo, v.68, p.102, 2001.

Silva AV, Cunha ELP, Meireles LR. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: Estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. Ciênc Rural, v.33, p.115-119, 2003.

Thibier M, Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. Anim Reprod Sci, v.62, p.233-251, 2000.

Van Vliet RA, Gibbins AMV, Walton JS. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y- specific DNA probes. Theriogenology, v.32, p.421-438, 1989.

Vasconcellos AS, Ito FH, Côrtes JA. Bases para a prevenção da brucelose animal Comun Cient Fac Méd Vet Zootec USP, v.11, p.25-36, 1987.

Young EH. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis, v.21, p.283-290, 1995.
