

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E TESTICULARES
DE OVINOS INFECTADOS POR *BRUCELLA OVIS***

Gustavo Montenegro Sobral

Graduando

Patos,
Abril de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E TESTICULARES
DE OVINOS INFECTADOS POR *BRUCELLA OVIS***

Gustavo Montenegro Sobral
Graduando

Profa. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo
Orientadora

Patos,
Abril de 2013

FICHA CATALOGRÁFICA
De acordo com AACR2, CDU, CUTTER
Biblioteca Setorial do CSTR/UFCG – Campus de Patos - PB

S677a
2013

Sobral, Gustavo Montenegro.

Avaliação das características espermáticas e testiculares de ovinos infectados por *brucella ovis* / Gustavo Montenegro Sobral. – Patos - PB: CSTR/UFCG/UAMV, 2013.

29 f.

Orientador: Norma Lúcia de Souza Araújo.

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

1 – Reprodução Animal. 2 – Ovino. 3 – Brucelose. 4 - Orquite I – Título.

CDU: 636.082.4

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

GUSTAVO MONTENEGRO SOBRAL
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para
obtenção do grau de Médico Veterinário.

ENTREGUE EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

_____ Nota _____

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

_____ Nota _____

Profª Drª. Norma Lúcia de Souza Araújo

_____ Nota _____

Profª Drª Melânia Loureiro Marinho

Dedico,

À minha bisavó,
por todo carinho
que ela deixou para a nossa família.

Agradecimentos

A Deus, que nos momentos de desespero foi com quem me apeguei, que nos momentos de choro sozinho no meu apartamento foi quem me consolou. Agradecer a ele por ter me dado o dom da Medicina Veterinária, e por tudo que vem me dando e as graças que vem realizando em minha vida.

À minha mãe, minha rainha, amiga (melhor amiga), agradeço a ela toda a envergadura moral que ela pode ter me ensinado, a todo o sacrifício que foi manter essa família unida, a tudo que ela me deu, aos não e aos sim que são tão importantes. Agradeço por acreditar em mim e na minha capacidade.

Ao meu pai que juntamente com minha mãe se sacrifica para ver seus filhos formados, e por também ter acreditado nos meus sonhos e nunca ter podado os mesmos, por ser um exemplo de homem digno e de caráter onde eu posso me espelhar.

Ao meu irmão, que por mais brigas que tivemos e temos, por mais que ele não concorde com algumas coisas minhas e eu com algumas dele, por ser meu irmão, talvez não fosse tão divertido se ele não existisse ele, como meu pai também, compõe o exemplo de homens para a minha vida, agradeço a ele por ser meu irmão mais velho, e o que seríamos de nós irmãos mais novos sem os mais velhos né? Obrigado irmão, te amo, na verdade amo todos da minha família.

À minha avó e meu avô por terem me dado a melhor mãe do mundo, por terem me proporcionado as melhores férias da minha vida, por terem sido realmente avós, por eu tê-los como segundos pais, onde eu posso me acolher e também por acreditarem em mim.

Ao Tomaz, meu primo irmão que me acompanha em tudo, só posso dizer obrigado por tudo, te amo.

Aos meus dois filhos que não pude ter o prazer de criar, mas que foram amados e que hoje são anjos no céu.

A Andréia, Adriana e Bibi por terem se tornado minha segunda família.

À minha bisavó Maria Amélia, que teve que partir porque o bom Deus a chamou. Sei que essa formatura é para ela, que nas noites antes de dormir dizia-me “te quero bem sabia?” foi assim que descobri o amor de uma bisavó e quão doce ele é, e sei que de onde ela estiver está vendo minhas conquistas e abençoando-as.

Aos amigos, que nada mais são que a família escolhida. Sem os amigos essa jornada não teria sido tão engraçada como foi. Aos amigos feitos nos cinco anos de

curso, que se tornaram uma família grande, virando noites de estudos para as provas de Imunologia, Ruminantes e entre outras provas. Por terem chorado e vibrado comigo a cada conquista. Foi difícil né pessoal? Mas acabou! Obrigado a Larissa Amaral, Lilianne Marinho, Karla Pollyanna, Renan Cardoso, Leandro Lamartine, Pietro Monteiro, Millena Nunes, Rafaela Beltrão, Sâmia Felizardo (obrigado pela sobrinha), Luma Freire e se foi esquecido alguém, me desculpe, é difícil nesse momento lembrar de todos!

Aos amigos de João pessoa não seria diferente, são amigos irmãos onde posso contar e sei que estarão ao meu lado. Agradeço a Ana Myrta, Eduardo Carvalho, Dimas Araujo, Rodolfo Barbosa, Larissa Zagel, Mayara Benevides, Matheus Gomes, Michelle Lima (mixa), Yve Gadelha, Nathalia Veríssimo, e me desculpe se faltou alguém, todos estão no meu coração e participaram ou participam da minha vida para sempre! Escolhi vocês porque são anjos que Deus fez questão de colocar em minha vida!

Aos mestres que me fizeram Médico Veterinário e me ensinaram o amor pela profissão e a batalha por um sonho.

A Raissa Oliveira por ter caminhado junto a mim por todos esses 5 anos de curso, primeiramente como namorada e depois como grande amiga que me ajudou nos momentos de dificuldades, sendo eles financeiros ou emocionais, Muito obrigado! Você é parte importante dessa jornada.

Ao João Bezerra, pessoa que caminhou comigo, acreditou no meu potencial, e dividiu comigo o amor.

Obrigado, por fim, a todos que acreditaram em mim.

RESUMO

SOBRAL, G. M. **Avaliação das características espermáticas e testiculares de ovinos infectados por *Brucella ovis***. [Avaliação de características seminais e testiculares de ovinos infectados com *Brucella ovis*]. 2013. 28f. Monografia (Medicina Veterinária) - Unidade Acadêmica de Medicina veterinária, Universidade Federal de Campina Grande.

A brucelose é uma enfermidade infecciosa de grande importância no contexto reprodutivo. Nos ovinos pode ocasionar relevantes perdas econômicas em virtude dos efeitos que provocam tanto nos machos, levando a quadros de epididimite e orquite, quanto nas fêmeas, com abortos esporádicos. Com base nesses aspectos o objetivo desse trabalho é observar se há alterações testiculares e alterações na morfologia e concentração espermática de carneiros infectados por *B. ovis*. Para este estudo foram utilizados 4 ovinos machos inteiros, da raça Santa Inês com um a dois anos de idade. Após o período de adaptação os animais foram divididos em dois grupos: o grupo controle, composto por 1 animal (n=1) e grupo tratado, composto por 3 animais (n=3). No grupo tratado os animais foram inoculados com uma suspensão infectante de *Brucella ovis*. Foram realizadas quatro coletas de sêmen de cada animal para avaliação da morfologia e concentração espermáticas. Avaliação ultrassonográfica do testículo e epidídimo foi realizada com intervalos quinzenais, até os 45 dias após a inoculação. Concluiu-se que não houve diferença estatística na avaliação da morfologia e concentração espermática dos ovinos nos grupos estudados e não foram identificadas alterações no testículo e epidídimo dos animais até 45 dias após a infecção ao exame ultrassonográfico até 45 dias após a inoculação da *B. ovis*.

Palavras-chave: Ovino. Brucelose. Orquite.

ABSTRACT

SOBRAL, G. M. **Avaliation of seminal and testicular characteristics of ram infected with *Brucella ovis***. [Avaliação das características espermáticas e testiculares de ovinos infectados por *Brucella ovis*]. 2013. 28f. Monografia (Medicina Veterinária) - Unidade Acadêmica de Medicina veterinária, Universidade Federal de Campina Grande.

Brucellosis is an infectious disease of great importance in the reproductive context. In sheep can cause significant economic losses due to the effects that cause, both males leading to conditions of epididymitis and orchitis, as in females, with sporadic abortions. Considering these aspects, the aim of this work is to observe if there are changes and alterations in testicular morphology and sperm concentration of sheep infected with *B. ovis*. For this study we used 4 sheep bulls, Santa Ines with one to two years of age. After the adaptation period, the animals were divided into two groups: the control group, consisting of 1 animals ($n = 1$) and treaty group, consisting of 3 animals ($n = 3$). In the treated group the animals were inoculated with a suspension of infectious *Brucella ovis*. Four samples were taken from each animal semen for evaluation of sperm morphology and concentration. The ultrasound evaluation of testis and epididymis was performed biweekly intervals, until 45 days after inoculation. It was concluded that there was no statistical difference in the assessment of morphology and sperm concentration of sheep in the studied groups and no changes have been identified in the testis and epididymis of animals to ultrasound examination 45 days after inoculation of *B. ovis*.

Keywords: Sheep. Brucellosis. Orchitis.

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1- Media \pm Desvio padrão da morfologia e concentração espermática de ovinos infectados por <i>Brucella ovis</i>	23

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1- Imagem ultrassonográfica do testículo direito do ovino pertencente ao grupo controle.....	24
Figura 2- Imagem ultrassonográfica do testículo direito de ovino infectado por <i>Brucella ovis</i> no dia da inoculação.....	
Figura 3- Imagem ultrassonográfica do testículo direito de ovino infectado por <i>Brucella ovis</i> 45 dias após a inoculação.....	

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão de Literatura.....	13
2.1 Anatomia testicular.....	13
2.1.1 O testículo.....	13
2.1.2 O epidídimo.....	13
2.2 Espermatogênese.....	14
2.3 Avaliação da qualidade do sêmen.....	14
2.4 Fatores que influenciam a qualidade do sêmen.....	15
2.5 Agentes infecciosos que influenciam a fertilidade em ovinos.....	15
2.6 <i>Brucella ovis</i>	16
2.6.1 Etiologia.....	16
2.6.2 Epidemiologia.....	17
2.6.3 Patologia.....	17
2.6.4 Diagnóstico.....	18
3 Material e Métodos.....	20
3.1 Local do experimento.....	20
3.2 Animais utilizados.....	20
3.3 Exames clínicos.....	20
3.4 Inoculação dos animais.....	20
3.5 Exame andrológico.....	21
3.5.1 Exame do testículo e epidídimo.....	21
3.5.2 Coleta e avaliação do ejaculado.....	21
3.5 Avaliação ultrassonográfica do testículo e epidídimo.....	21
3.6 Análise Estatística.....	21
4 Resultados e Discussão.....	23
5 Conclusões.....	24
6 Referências.....	26

1 Introdução

Em todo o Brasil, há 16 milhões de ovinos, que distribuem-se entre a produção de lã do Sul e de leite e carne do Nordeste. Onde o crescimento do rebanho é marcante com aproximadamente 9,3 milhões de cabeças, segundo dados do IBGE.

Na Paraíba, ainda segundo o IBGE, em oito anos, a criação de ovinos teve um salto de 21%, em detrimento a uma evolução de 18% do rebanho caprino. São mais de 400 mil cabeças de ovinos deslanados, ou cerca de 4% do rebanho nordestino, concentradas principalmente na região da Borborema e Sertão paraibano.

Com a expansão da ovinocultura no Brasil ocorreram importações de animais de vários países, além de ter se intensificado o trânsito no território nacional. Com isso, foram introduzidas doenças, antes inexistentes no plantel nacional, e outras enfermidades foram difundidas por toda área territorial.

Dentre as enfermidades infecciosas a brucelose possui grande importância por assumir caráter reprodutivo e infeccioso. Nos ovinos, as perdas econômicas são decorrentes, nos machos por lesões como epididimite, orquite e vesiculite, enquanto nas fêmeas, as lesões mais observadas são vaginocervicite e endometrite associadas a abortamentos esporádicos (ARIAS; CÁRDENAS, 2007), além de ocasionar nascimento de animais fracos e morte perinatal, resultando em baixos índices reprodutivos (ESTEIN, 1999).

O comprometimento das atividades reprodutivas nos rebanhos infectados por *B. ovis* causa perdas econômicas relevantes ao sistema de produção de ovinos (RAMOS *et al.*, 1966; BURGUES *et al.*, 1982; GIL TURNES, 2007) . Em razão disso, há levantamentos soropidemiológicos realizados em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil, com a finalidade de determinar a prevalência da brucelose nos rebanhos ovinos, para que sejam tomadas medidas de controle funcionais.

Com base nesses aspectos o objetivo desse trabalho foi observar se há alterações testiculares e alterações na morfologia e concentração espermática de carneiros infectados por *B. ovis*.

2 Revisão de literatura

2.1 Anatomia testicular

2.1.1 O testículo

Os testículos são envolvidos por uma cápsula chamada albugínea, de tecido conjuntivo, rico em fibras colágenas. Cada testículo divide-se em 250 lóbulos testiculares. São constituídos por túbulos seminíferos imersos em tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células intersticiais, também conhecidas como células de Leydig. Os túbulos seminíferos consistem em uma túnica de tecido conjuntivo, uma lâmina basal e uma camada interna, constituída pelo epitélio seminífero ou germinativo, que é onde ocorre a espermatogênese e a espermiogênese (DYCE *et al.*, 1997).

Durante a puberdade, no testículo, as células de Leydig ou células intersticiais, que estavam quiescentes, tornam-se arredondadas ou poligonais, com núcleo central e citoplasma com gotículas de lipídios. Essas células são responsáveis pela produção da testosterona, o hormônio sexual masculino (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

2.1.2 O epidídimo

O epidídimo tem função de transporte e armazenamento de espermatozóides produzidos no testículo, além de atuar como túbulo coletor das secreções dos testículos. A maturação do espermatozóide significa a aquisição da capacidade fertilizante a qual inclui a obtenção da motilidade, mudanças morfológicas das características de membrana e do metabolismo dos espermatozóides (HAFEZ, 1995).

Processos inflamatórios no epidídimo podem ocasionar a obstrução deste, levando a um estado de azoospermia, situação esta que leva a um estado de infertilidade que, pode ser ou não reversível (HAFEZ, 1995).

2.2 Espermatogênese

É o processo pelo qual as células primordiais chamadas espermatogônias se transformam em espermatozóides ou gametas masculinos (SCARANO, 2009).

É um evento altamente organizado e precisamente sincronizado, no qual espermatogônias diplóides dividem-se por mitose para manter sua população. A espermatogênese ocorre nos testículos, de modo permanente e contínuo, a partir da puberdade, quando os níveis hormonais de FSH e LH elevam-se e ocorre o amadurecimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonádico, sob o controle fisiológico do sistema neuroendócrino, sofrendo influência direta da termorregulação escroto-testicular (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

O ciclo espermatogênico é o tempo gasto na divisão da espermatogônia. Em ovinos, esse ciclo leva cerca de 10 dias, mas há uma relação bastante precisa entre a duração do ciclo espermatogênico e a espermatogênese, sendo que a segunda leva em média quatro a cinco vezes o tempo do ciclo espermatogênico; portanto, o processo dura 49 dias em ovinos, iniciando-se após a puberdade. O ciclo espermatogênico dos caprinos tem em média 10 a 11,5 dias, com a espermatogênese durando cerca de 50 a 53 dias (JOHNSON, 1991).

No carneiro, as espermatogônias dividem-se a cada 10,4 dias, e poderiam gerar, oito dias depois, em teoria, 64 espermátocitos I, cuja prófase dura 14 dias. Estes entram em meiose, que dura cerca de 24 horas, originando potencialmente 256 espermátides que gerarão, após 14 dias, igual número de espermatozóides, os defeitos (CASTRO *et al.*, 1997).

2.3 Avaliação da qualidade do sêmen

A qualidade seminal refere-se a integridade da estrutura espermática, determinada pela motilidade progressiva, morfologia espermática, pH do sêmen e número de espermatozóides no ejaculado. A qualidade do sêmen reflete o estado funcional do epitélio seminífero do testículo e as funções de maturação, transporte e armazenamento do epidídimo (COULTER, 1994).

O ejaculado, no ovino, para ser considerado normal ele deve apresentar algumas características, tais como: cor pérola ou marfim, volume do ejaculado variando de 0,5 a 2,0 mL e concentração espermática de 2 a 5 bilhões de espermatozoides/mL (MAIA *et al.* 2011). Quanto à morfologia espermática, Pacheco (2009) determinou, para a raça Santa Inês valores de 4,4% para defeitos maiores, 28,4% para os defeitos menores e 32% para os defeitos totais.

2.4 Fatores que influenciam a qualidade do sêmen

Fatores climáticos como temperatura, umidade do ar e fotoperíodo afetam a capacidade reprodutiva dos ovinos. Em regiões de clima tropical, a alta temperatura ambiental observada no período seco é o principal fator limitante à eficiência reprodutiva, pois pode interferir na termorregulação testicular repercutindo negativamente na espermatogênese e, conseqüentemente, na qualidade do sêmen. No carneiro, as características seminais mais afetadas pelas altas temperaturas são motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática (MAIA *et al.*, 2011).

A energia da dieta parece ser o fator nutricional mais importante associado aos problemas reprodutivos, sendo que o excesso de energia é mais prejudicial que a sua falta (BEARDEN *et al.*, 2004).

2.5 Agentes infecciosos que influenciam a fertilidade em ovinos

Infecções bacterianas e virais podem comprometer os mais variados órgãos de um animal inclusive o sistema reprodutivo, causando subfertilidade ou infertilidade (CARVALHO JUNIOR, 2010).

Em machos da espécie ovina, de acordo com Hajtós *et al.*, (1987), a maioria dos casos de epididimite e orquite de origem bacteriana estão relacionados com a *Brucella ovis*, *Histophilus somni* e *Actinobacillus seminis*. Estudos sorológicos e bacteriológicos demonstraram a infecção por *Brucella ovis* em 79,5% dos carneiros adultos com lesões no epidídimo.

Actinobacillus seminis e *Histophilus somni* são os dois agentes mais freqüentemente isolados do organismo de carneiros jovens com lesões no epidídimo (WALKER *et al.*, 1986), porém outros agentes como *Salmonella enterica* sorotipo *Diarizonae* (FERRERAS *et al.*, 2007), *Arcanobacterium pyogenes* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* podem estar associados a epididimites em carneiros (JANSEN, 1980).

2.6 *Brucella ovis*

2.6.1 Etiologia

O agente etiológico da brucelose ovina é uma bactéria intracelular facultativa, pertencente ao gênero *Brucella*. Dentro deste gênero são descritas seis espécies independentes, cada uma com seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *Brucella melitensis* (caprinos e ovinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella canis* (caes), *Brucella neotomae* (rato do deserto) e *Brucella maris*. Esta é representante de duas cepas diferentes, sendo uma isolada de cetáceos e a outra de focas, mas ainda não reconhecida oficialmente (MERINO, 2004).

Estas bactérias estão classificadas em dois grupos antigênicos distintos, as de morfologia colonial lisa ou clássica (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*), que quando evoluem para formas rugosas ou mucóides deixam de ser patogênicas, e as rugosas (*B. ovis* e *B. canis*). Além de determinar a morfologia colonial, a composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular é elemento central nos fenômenos imunológicos (PAULIN, FERREIRA NETO, 2003).

As brucelas são cocobacilos ou pequenos bastonetes gram-negativos não esporulados, desprovidos de cápsula e imóveis que medem 0,5 - 0,7 μ de largura por 0,6 - 1,5 μ de comprimento e podem ser visualizados à microscopia óptica, isolados ou em curtas cadeias. Crescem melhor em meios enriquecidos (vitaminas do complexo B, soro, sangue) e em atmosfera com 5 a 10% de gás carbônico. Não produzem gás à fermentação de carboidratos e não liquefazem a gelatina (Bier, 1978). Não são ácido-resistentes, mas podem resistir a descoloração por alcoóis ou alcalis fracos. Coram-se pelo Ziehl-Neelsen e Koster modificados (PAULIN, FERREIRA NETO, 2003).

Quanto a resistência, as bactérias do gênero *Brucella* comportam-se de modo variado frente a diferentes condições ambientais. Embora não se multipliquem no ambiente, a capacidade de sobrevivência em condições naturais é grande quando comparada com outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambiente úmido, ao abrigo da luz solar direta, em pH neutro e em ambiente contendo matéria orgânica, como produtos de aborto, fezes, leite e manteiga. A viabilidade das bactérias aumenta em temperaturas baixas podendo resistir muitos anos em tecidos congelados (PAULIN, FERREIRA NETO, 2003).

2.6.2 Epidemiologia

A infecção por *B. ovis* tem distribuição geográfica cosmopolita, não se tratando de uma zoonose, tendo sido diagnosticada na Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, Chile, França, Alemanha, Hungria, México, Nova Zelândia, Peru, Rússia, República da Eslováquia, África do Sul, EUA e Uruguai (BUCKRELL 1985; NILO *et al.*, 1986; ROBLES *et al.*, 1998; ARSENAULT *et al.*, 2004; ISHIZUKA, 2005).

No Brasil, a *Brucella ovis* foi diagnosticada pela primeira vez no Rio Grande do Sul (RAMOS *et al.*, 1966). Na Paraíba, 8,6% das propriedades apresentaram evidências sorológicas da doença, com prevalência de 5,6% de reprodutores sororreagentes (CLEMENTINO *et al.*, 2007). Em Minas Gerais, foi demonstrada soroprevalência de 5,3% para *B. ovis* em ovinos e o percentual de propriedades positivas foi de 29,4% (MARQUES, 2006).

A brucelose ovina tem sido descrita mais frequentemente em animais que atingiram a maturidade sexual, mas ovinos jovens também podem ser afetados. O sêmen contaminado por *B. ovis* é a principal fonte de infecção, portanto, acredita-se que a transmissão da doença ocorra principalmente de forma venérea, mas a transmissão por contato direto também pode ocorrer (BURGUES *et al.*, 1982). As fêmeas também transmitem a doença de forma venérea quando, no mesmo período do estro, copulam com um macho saudável após copular com um macho infectado. Porém, em contraste com a brucelose bovina, a placenta de ovelhas infectadas não é considerada uma importante fonte de infecção para animais vulneráveis (HARTLEY *et al.*, 1955). Experimentalmente, a doença foi reproduzida por inoculação do agente pelas vias intragenital, intraconjuntival, intratesticular, intravenosa e intranasal (BURGUES *et al.*, 1982; CARVALHO JÚNIOR *et al.*, 2012).

2.6.3 Patologia

A *B. ovis* se estabelece no sistema genital, causando nos machos epididimite geralmente unilateral, atrofia testicular e, conseqüentemente, baixa fertilidade (BUCKRELL, 1985; NILO *et al.*, 1986; CERRI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005). Além da doença nos machos, abortos ocasionais em ovelhas e mortalidade perinatal são

freqüentes em rebanhos acometidos por *B. ovis* (CERRI *et al.*, 2002). As lesões estão praticamente restritas ao sistema genital (BUCKRELL, 1985).

Segundo Biberstein *et al.*, (1963), Swift e Weyerts (1969) e Walker *et al.*, (1986), as lesões causadas por *B. ovis* são geralmente encontradas no epidídimo. A bactéria causa edema perivascular e infiltração de linfócitos, seguido por hiperplasia, fibrose e obstrução do ducto epididimário, que resulta em retenção do conteúdo. Além disso, pode ocorrer metaplasia do epitélio epididimário (BIBERSTEIN *et al.*, 1963). Em alguns casos, todo o epidídimo está afetado, mas, geralmente, há comprometimento inicial da cauda do epidídimo. As lesões secundárias dependem do extravasamento de espermatozoides, promovendo inflamação crônica, fibrose difusa e formação de granuloma espermático.

São encontradas lesões palpáveis no epidídimo (WALKER *et al.*, 1986), na maioria dos casos unilateral, mas, também podem ocorrer lesões bilaterais (BAGLEY, 1985; ROBLES *et al.*, 1998). As lesões testiculares são sempre secundárias às do epidídimo. A atrofia testicular é mais comum (CERRI *et al.*, 2002) e acentuada nos casos de aderência (BIBERSTEIN *et al.*, 1963; SWIFT e WEYERTS, 1969). Também podem ocorrer aumento e edema da glândula vesicular e, em alguns casos, a glândula vesicular pode estar infectada enquanto o epidídimo está livre de lesões e bactérias, sugerindo que a *B. ovis* também tenha tropismo pela glândula vesicular (BIBERSTEIN *et al.*, 1963).

Segundo Robles *et al.*, (1998), carneiros infetados com *B. ovis* frequentemente apresentam sêmen de baixa qualidade, grande quantidade de células inflamatórias, particularmente neutrófilos. Também ocorre diminuição na concentração espermática (BUCKRELL, 1985). A diminuição na qualidade do sêmen está associada a lesões palpáveis causadas pela *B. ovis*. Carneiros com lesões nos dois testículos possuem sêmen de pior qualidade, quando comparados a animais com lesões unilaterais. Além disso, a qualidade do sêmen de carneiros que apresentam células inflamatórias no ejaculado é pior quando comparada com o de animais que não apresentam células inflamatórias (BAGLEY *et al.*, 1984).

2.6.4 Diagnostico

O diagnóstico presuntivo é baseado no exame clínico e deve ser confirmado pelo isolamento da *B. ovis* e provas sorológicas (SANTOS *et al.*, 2005). Ou seja pela avaliação dos sinais clínicos (baixos índices de fertilidade do rebanho, abortos, natimortos, epididimite e raramente orquite).

As provas mais empregadas são a dupla Imunodifusão em Gel de Ágar (AGID), ELISA indireto e Fixação de Complemento (FC). Vários países adotam diferentes métodos sorológicos para detecção de anticorpos contra *B. ovis*, no entanto a prova padrão ainda é a FC. Contudo, o teste de AGID oferece resultado de sensibilidade comparáveis com a FC, porém de mais fácil execução (ISHIZUKA, 2005). A reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido usado com sucesso como método de diagnóstico para *B. ovis* (SAUNDERS *et al.*, 2007) e recentemente foi validado o primeiro método de PCR específico para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* (XAVIER *et al.*, 2009).

Também, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima-ELISA e ao cultivo bacteriano do agente no sêmen ou urina, método esse que confirma o diagnóstico de brucelose (BURGUES *et al.*, 1982; GIL TURNES, 2007). Atualmente, também se tem utilizado métodos moleculares (reação em cadeia da polimerase-PCR) baseados na amplificação de fragmentos de DNA para detecção de *B. ovis* do sêmen e da urina de ovinos infectados (XAVIER *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012).

3 Material e Métodos

3.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (CSTR-UFCG), na cidade de Patos, Paraíba.

3.2 Animais utilizados

Foram utilizados 4 ovinos machos inteiros, da raça Santa Inês com um a dois anos de idade, que apresentaram, ao teste sorológico (IDGA) e ao cultivo microbiológico do sêmen, resultados negativos para brucelose. Os ovinos foram identificados e passaram por um período de adaptação de 45 dias, durante o qual, foram submetidos à vermifugação e exames clínicos para atestar sua sanidade. Durante a execução do experimento, os ovinos foram mantidos em baias individuais e receberam ração comercial em quantidade correspondente a 1,5% do peso vivo, além de feno de tifton (*Cynodon dactylon*) e água *ad libitum*.

3.3 Exames clínicos

Os exames foram realizados antes da inoculação, 48 horas após a inoculação e em intervalos de sete dias até completar nove semanas pós-inoculação, foi avaliado temperatura retal, feita dentro das baias para evitar o estresse do animal, avaliação da hidratação com a tração da pele para avaliar o nível de desidratação se assim existisse.

3.4 Inoculação dos animais

Após o período de adaptação os animais foram divididos em dois grupos: o grupo controle, composto por 1 animal (n=1) e grupo tratado, composto por 3 animais (n=3). No grupo tratado os animais foram inoculados com uma suspensão infectante de *Brucella ovis* (cepa ATCC25840) com concentração de $1,7 \times 10^{10}$ unidade formadora de colônia/mL. A inoculação deu-se por via intrapreucial e conjuntival simultaneamente.

A inoculação intraprepucial foi realizada com auxílio de uma sonda com volume total de suspensão infectante de 2 mL. A inoculação por via conjuntival foi realizada instilando 50 µL de suspensão infectante em cada olho. Os outros dois animais formaram o grupo controle.

3.5 Exame andrológico

3.5.1 Exame do testículo e epidídimo

Foi realizado o exame por meio de palpação, onde foram avaliados parâmetros como simetria testicular, mobilidade dentro do saco escrotal e consistência testicular.

3.5.2 Coleta e avaliação do ejaculado

Foram realizadas quatro coletas de sêmen de cada animal, a partir da segunda semana pós inoculação, obedecendo o intervalo de uma semana a cada coleta realizada. As amostras de sêmen foram coletadas com o auxílio de um eletroejaculador. Previamente à coleta de sêmen, a região prepucial de cada animal foi higienizada com solução de álcool a 70% e papel toalha e, quando necessário, realizada a tricotomia. A concentração espermática foi determinada usando uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (400x) a partir de amostras de sêmen diluídas (1:400) em solução de formol citrato. Para avaliar a morfologia espermática, amostras de sêmen foram também diluídas (1:400) em solução de formol citrato e avaliadas com microscópio de contraste de fase (Olympus BX-41) em aumento de 1000x com imersão. A porcentagem de defeitos espermáticos foi calculada com base na contagem de 100 células por amostra de sêmen.

3.5 Avaliação ultrassonográfica do testículo e epidídimo

Foram realizadas três avaliações ultrassonográficas, com intervalos quinzenais, sendo a primeira realizada no dia da inoculação e a última aos 45 dias após a inoculação.

Os testículos e epidídimos foram examinados utilizando um aparelho de ultrassom CHISON D600VET com o uso de um transdutor linear (5 MHz) em duas direções, dorso-ventral e latero-medial.

3.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA e comparação das médias pelo teste de Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test para as variáveis concentração espermática e morfologia espermática, ao nível de 5% de significância.

4 Resultados e Discussão

Os resultados das médias e desvio padrão encontradas no estudo de carneiros infectados por *Brucella ovis* obtidos no presente trabalho estão apresentados na tabela 2.

Não houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os parâmetros seminais avaliados nas coletas de cada animal dentro de um mesmo grupo e entre os grupos diferentes, estando os valores dos parâmetros espermáticos obtidos, dentro da normalidade. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Quispe *et al.*, (2002), onde relatam que alterações espermáticas em ovinos infectados por *Brucella* só se manifestam a partir da nona semana de infecção. Neste trabalho foram realizadas quatro coletas de sêmen por animal, tanto no grupo controle quanto no grupo de animais infectados. As coletas, em intervalos semanais, transcorreram até a quinta semana após a inoculação da *Brucella* o que pode justificar a ausência de efeitos nos parâmetros espermáticos avaliados no presente trabalho, conforme relatam os autores acima citados.

Tabela 1- Média \pm Desvio padrão da morfologia e concentração espermática de ovinos infectados por *Brucella ovis*.

Animal	n	Morfologia Espermática			Concentração Espermática
		D Mai (%)	D Men (%)	DTot (%)	
Controle	4	9,75 \pm 2,87	11,25 \pm 1,28	21 \pm 3,91	8563x10 ⁶ \pm 7870x10 ⁶
B3	3	9,66 \pm 3,05	9,66 \pm 2,08	19,33 \pm 5,13	7333x10 ⁶ \pm 3329x10 ⁶
B9	4	8,25 \pm 5,12	7,50 \pm 3,51	15,75 \pm 8,61	6563x10 ⁶ \pm 4934x10 ⁶
B21	3	8,33 \pm 4,93	8,33 \pm 4,93	15 \pm 7,81	8100x10 ⁶ \pm 4338x10 ⁶

D Mai- Defeitos espermáticos maiores
 D Men- Defeitos espermáticos menores
 D Tot- Defeitos espermáticos totais
 n- números de coletas

Cameron e Laureman Jr, (1976) também relataram que a infecção por *Brucella ovis* causa diminuição da concentração seminal, no entanto, os mesmos não indicam o período de infecção, a partir do qual essa alteração se manifesta.

A avaliação ultrassonográfica dos testículos e epidídimos dos animais infectados não revelou alterações morfológicas no animal do grupo controle (Figura 1) e em nenhum animal do grupo tratado, tanto no dia da inoculação (Figura 2) quanto aos 45 dias após a inoculação (Figura 3), conforme demonstrado a seguir.



Figura 1- Imagem ultrassonográfica do testículo direito do ovino pertencente ao grupo controle



Figura 2- Imagem ultrassonográfica do testículo direito de ovino infectado por *Brucella ovis* no dia da inoculação

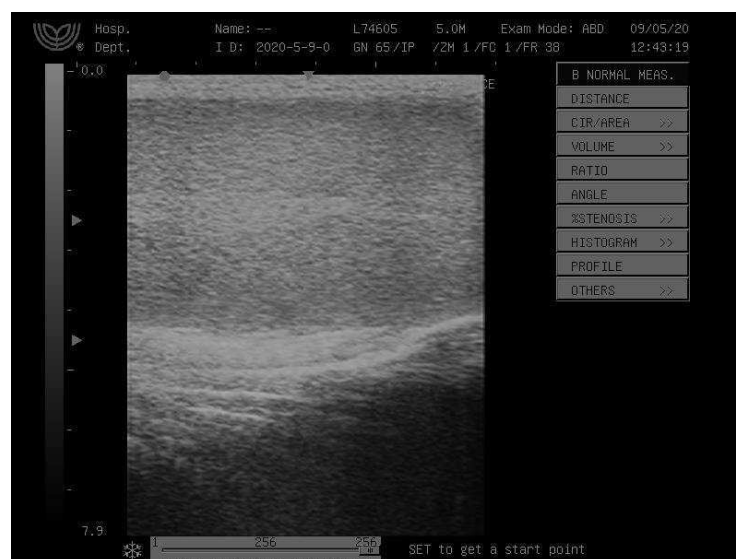


Figura 3- Imagem ultrassonográfica do testículo direito de ovino infectado por *Brucella ovis* 45 dias após a inoculação

Ainda, Robles, (2008), relatou que, em animais submetidos à infecção experimental, as lesões tendem a aparecer entre 15 e 45 dias pós-inoculação, o que não ocorreu no presente trabalho.

Hughes e Claxton (1968) descrevem a eliminação de *B. ovis* no sêmen de animais clinicamente normais por longos períodos. Estes animais assintomáticos podem, inclusive, apresentar fertilidade normal representando um risco importante para a disseminação da doença no rebanho. Esse fato pode ter ocorrido nos animais do presente experimento, já que pelo que foi observado os animais estavam infectados, mas apresentavam-se assintomáticos, pois os mesmos não apresentaram alterações nem ao exame clínico, nem nas avaliações espermática e ultrassonográfica.

Segundo Burgess *et al.*, (1982), a infecção por *B. ovis* resulta em alterações significativas dos parâmetros espermáticos mais evidentes quanto mais acentuadas forem as lesões nos epidídimos. As alterações clínicas decorrentes da infecção levariam à diminuição do número de espermatozoides no ejaculado, diminuição de motilidade dos mesmos e aumento de patologias espermáticas (RIDLER *et al.*, 2002). As alterações espermáticas mais observadas são defeitos de peça intermediária e de cauda, além de cabeças isoladas (KIMBERLING *et al.*, 1986), o que não foi encontrado no presente estudo.

5 Conclusões

Os animais infectados experimentalmente pela bactéria *Brucella ovis* não apresentaram influencia significativa, para os dados de concentração e morfologia espermáticas. Nas análises ultrassonográficas, não houveram mudanças morfológicas ate os 45 dias de infecção com a bactéria.

Mais estudos devem ser realizados no sentido de identificar possíveis alterações espermáticas, testiculares e epididimárias em ovinos infectados por *Brucella ovis* após um período superior a 45 dias.

6 Referências

- BURGUESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v.7, p. 551-575, 1982.
- CAMERON, R. D. A.; LAUERMAN Jr., L. H. **Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams**. The Veterinary Record, v.99, n.12, p.231-233, 1976.
- CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; COSTA, L.F.; SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, T.A.; BORGES, A.M.; GOUVEIA, A.M.G.; SANTOS, R.L.. **Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis***. Small Ruminant Research, v.102, p. 213-222, 2012.
- CASTRO, A.C.S.;BERNDTSON, W.E.; CARDOSO, F.M.Cinética e quantificação da espermatogênese: **bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos**. Revista Brasileira de Reprodução animal, v.21, n.1, p.25-34, 1997.
- FERRERAS MC, MUÑOZ M, PÉREZ V, BENAVIDES J, GARCIA-PARIENTE C, FUERTES M, GARCÍA-MARÍN GAJF. **Unilateral orchitis and epididymitis caused by *Salmonella entérica* subspecies *diarizonae* infection in a ram**. *J Vet Diagn Invest*, v.19, p.194-197, 2007.
- GIL-TURNES, C. Brucelose ovina. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J.. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, Cap.3, p.240-248, 2007.
- HAFEZ, B; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal, 7º ed. Barueri: Manole, 2004.
- HAJTÓS I, FODOR LG, GLÁVITS R, VARGA J. Isolation and Characterization of *Actinobacillus seminis* Strains from ovine semen samples and epididymitis. *J Med*, v.34, p.138-147, 1987.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pecuária 2010 - Rebanho ovino**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 22 set. 2012.
- JOHNSON, L.**Spermatogenesis**. Cap 5. In: CUPPS, P.T. Reproduction in domestic animals.San Diego: Academic Press, 1991.
- MAIA *et. al.*, **Características reprodutivas de carneiros no Nordeste Brasileiro: parâmetros seminais**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.35, n.2, p.175-179, abr./jun. 2011. Disponível em <www.cbra.org.br> acesso m 10 de jan de 2013
- QUISPE, C. H. R.; RIVERA, G. H.; ROSADIO, A. R. **Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre**.Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, v.13, n.1, p.61-66, 2002.
- SCARANO. W.R. **GAMETOGENESE MASCULINA: ESPERMATOGENESE**. Deparmatendo de ciências biomédicas. UNIFAL, Minas Gerais, 2009. Disponível em <<http://pt.scribd.com/doc/24970127/Espematogenese-2009>> acesso em 23 de set. 2012.

WALKER RL, LEAMASTER BR, STELLFLUG JN, BIBERSTEIN EL. **Association of age of ram with distribution of epidymal lesions and etiologic agent.** *J Am Vet Med Assoc*, v.188, p.393-396, 1986.

ESTEIN, S. M. **Imunological aspects in the diagnosis and control of contagious epidymitis of rams by *Brucella ovis*.** *Archivos de Medicina Veterinária*, v.31, n.1, p.1-18, 1999.

ARIAS, Y.; CÁRDENAS, B. **Diagnóstico de brucelosis em ovinos com antígeno de Rosa Bengala al 3 e 8%.** *Revista Unellez de Ciencia y Tecnologia*, v. 25, p. 40-43,2007.

CARVALHO JUNIOR, C. A; XAVIER, M. N; COSTA, L. F.; SILVEIRA, S. S; SANT'ANNA, F. M; BORGES, A. M; GOUVEIA, A. M.G.; SANTOS, R. L. **Agentes infecciosos que podem promover infertilidade em machos da espécie ovina.** *Revista Brasileira de Produção Animal*, v. 34, n. 3, p. 160-167, 2010.

COULTER, G.H.; COOK, R.B.; KASTELIC, J.P. **Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality, and sperm production in young beef bulls.** *J. Anim. Sci.*, v.75, p.1048-1052, 1997.

BEARDEN JH, Fuquay JW, Willard ST. **Applied animal reproduction.**6.ed.Upper Saddle River:Pearson-Prentice Hall,2004.427p.

PAULIN, L. M. **Brucelose.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 70, n. 2, p. 239-249, 2003

BUCKRELL BC, MCEWEN SA, JOHNSON WH, SAVAGE NC. **Epididymitis caused by *Brucella ovis* in a Southern Ontario sheep flock.** *Can Vet J*,v.26, p.293-296, 1985.

NIILO L, MACDONALD DW, GODKING GF, STONE W. **Ovine Brucellosis in Alberta.** *Can VetJ*, v.27, p.245-249, 1986.

ROBLES CA, UZAL FA, OLAECHEA FV, LOW C. **Epidemiological observations in a corriedale flock affected y *Brucella ovis*.***Vet Res*, v.22, p.435-443, 1998.

ARSENAULT J, GIRARD C, DUBREUIL P, BÉLANGER D. **Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams in Quebec.** *Can Vet J*, v.45, p.312-313, 2004.

ISHIZUKA M, LEITE L, DINIZ O. **Epidemiologia e profilaxia da epididimite infecciosa ovina (Brucelose ovina).** 2005 Disponível em:
<<http://www.cda.sp.gov.br/www/programas/index.php?action=view&cod=22&ar=1&n m=Sanidade%20Animal>> acessado em 25 de janeiro de 2012.

MARQUES AP. **Caracterização soroepidemiológica da infecção por vírus Maedi-visna e *Brucella ovis* em ovinos do estado de Minas Gerais.** 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CERRI D, AMBROGI C, EBANI VV, POLIA, CAPPELLI F, CARDINI G, ANDREANI E. **Experimental Brucella ovis infection in Mouflon (OVIS MUSIMON)**. J Wildl Dis, v.38, p.287-290, 2002.

SANTOS RL, POESTER FP, LAGE AP. **Infecção por Brucella ovis**. Cad Tec Vet Zootec, v.47, p.42-56, 2005.

BIBERSTEIN EL, MACGROWAN B, OLANDER H, KENNEDY PC. **Epididymitis in rams. Studies on pathogenesis**. Cornell Vet, v.57, p.27-41, 1963.

SWIFT B, WEYERTS P. **Ram epididymitis. A study on infertility**. Cornell Vet, v.60, p.204-214, 1969.

ROBLES CA, UZAL FA, OLAECHEA FV, LOW C. **Epidemiological observations in a corriedale flock affected by Brucella ovis**. Vet Res, v.22, p.435-443, 1998.

BAGLEY CV, PASKETT ME, MATTHEWS NJ, STENQUIST NJ. **Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah**. J Am Vet Med Assoc, v.186, p.798-801, 1985

XAVIER M N, COSTA LF, ROBLES CA, SILVA TMA, COSTA EA, PAIXÃO TA, MOUSTACAS VS, CARVALHO JUNIOR CA, LAGE AP, MEGID J, TSOLIS RM, SANTOS RL. **Development and evaluation of specific PCR assay for detection of Brucella ovis infection on rams**. In: Annual Brucellosis Research Conference, 62, 2009, Chicago. Proceedings... Chicago, IL:[s.n.], 2009.