

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**ESTUDO ANDROLÓGICO E ULTRASSONOGRÁFICO EM CARNEIROS DURANTE O
CURSO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *BRUCELLA OVIS***

(Dissertação)

Custódio Antonio Carvalho Júnior

**Belo Horizonte
2010**

Custódio Antonio Carvalho Júnior

**ESTUDO ANDROLÓGICO E ULTRASSONOGRÁFICO EM CARNEIROS DURANTE O
CURSO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *BRUCELLA OVIS***

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre.

Curso: Mestrado em Ciência Animal

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Renato de Lima Santos

Belo Horizonte
Escola de Veterinária ó UFMG
2010

Dissertação defendida em 30 de Agosto de 2010, pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Renato de Lima Santos
(orientador)

Dr. Sony Dimas Bicudo

Profa. Tatiane Alves da Paixão

Dr. Alessandro de Sá Magalhães

Dra. Érica de Azevedo Costa

Dedico aos meus pais, Custodio e
Helena, meus irmãos Vinícius e Vanessa
e ao meu Sobrinho Lucca pelo apóio e
companheirismo em todos os momentos
de minha vida.

õFeliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.õ

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre estar a meu lado.

A minha família em especial aos meus avós Thomaz de Paiva Carvalho e Ester Motta Carvalho (*in memoriam*), Jaime Couto Perroni (*in memoriam*) e Helena Romanelli Perroni pelo exemplo de caráter, conduta e honestidade.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos professores e amigos Carolina Maria Vianna de Freitas, Humberto de Mello Brandão e Oiti José de Paula, pelos ensinamentos, incentivo, amizade, e exemplo.

Ao Prof. Renato de Lima Santos, pelo exemplo, confiança, apoio, orientação, paciência, amizade e pelos valiosos ensinamentos. Meu eterno agradecimento.

À Profa. Aurora Maria Guimarães Gouveia e ao Prof. Alan Maia Borges pela co-orientação, confiança, amizade, companheirismo, pelos valiosos ensinamentos e apoio em todos os momentos da execução deste trabalho.

Aos professores do Setor de Reprodução Animal, Alan Maia Borges, Antônio de Pinho Marques Júnior, José Monteiro da Silva Filho e Vicente Ribeiro do Vale Filho, pelos ensinamentos prestados.

Aos colegas de pós-graduação, Valéria Moustacas, Érica Costa, Sílvia França, Luciana Fachini, Teane Silva, Mariana Xavier, Juliana Paniago, Ana Patrícia Carvalho, Auricélio Macêdo, Roberta Rosa, Taismara de Oliveira e Joice de Sá pela ajuda, companhia e pelos bons momentos proporcionados.

Aos alunos e ex-alunos de iniciação científica Felipe Machado, Fernanda Miranda, Fernanda Merlo, Stefane Silveira, Laura Vargas, Jader Bastos, Carolina Resende e Mayara Lombardi pela disponibilidade e cooperação durante os experimentos.

À Adriana Amantino, pelo apoio, disponibilidade e amizade.

À Profa. Tatiane Paixão, pela inestimável ajuda na realização deste trabalho.

Às amigos Alessandro de Sá, Augusto Borim, Renato Borim e Túlio Borim pela amizade e convivência.

Aos animais que doaram suas vidas para que este trabalho pudesse se concretizar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do estudo.

À todos os colegas de pós-graduação que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. GÊNERO <i>BRUCELLA</i>	14
2.2. EPIDIDIMITE OVINA	15
2.3. DIAGNÓSTICO	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. ADAPTAÇÃO DOS ANIMAIS	17
3.2. COLETA DE SEMÊN	17
3.3. INOCULAÇÃO	18
3.4. EXAME CLÍNICO	18
3.5. AVALIAÇÃO DO SEMÊN	18
3.6. EXAME ULTRASSONOGRÁFICO	19
3.7. HISTOLOGIA	19
3.8. MORFOMETRIA E PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA	19
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biometria dos testículos e da cauda do epidídimo. Média e desvio padrão (dp) dos nove carneiros avaliados antes da infecção por <i>Brucella ovis</i> .	21
Tabela 2. Características dos ejaculados avaliados imediatamente após a coleta. Média e desvio padrão (dp) dos nove carneiros avaliados antes da infecção por <i>Brucella ovis</i> .	21
Tabela 3. Largura e comprimento das caudas dos epidídimos e dos testículos de carneiros experimentalmente infectados com <i>Brucella ovis</i> .	29
Tabela 4. Alterações de sensibilidade, consistência e ecogenicidade encontradas nas caudas dos epidídimos de carneiros experimentalmente infectados com <i>Brucella ovis</i> .	30
Tabela 5. Médias e desvios padrão para os tipos de defeitos encontrados nos espermatozóides de carneiros experimentalmente infectados por <i>Brucella ovis</i> em diferentes tempos de infecção.	35
Tabela 6. Células inflamatórias no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com <i>Brucella ovis</i> em diferentes tempos de infecção.	36
Tabela 7. Morfometria testicular e contagem diferencial das células do epitélio seminífero de carneiros experimentalmente infectados com <i>Brucella ovis</i> (Tratamento) e carneiros sadios (referência).	39
Tabela 8. Correlação entre os parâmetros clínicos, ultrassonográficos e espermáticos de animais experimentalmente infectados com <i>Brucella ovis</i> .	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Consistência testicular de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $p < 0,05$). **22**
- Figura 2.** Circunferência escrotal de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média e as barras verticais o desvio padrão de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $P < 0,05$). **23**
- Figura 3.** Imagens ultrassonográfica e macroscópica do parênquima testicular de um carneiro após 180 dias de infecção experimental com *B. ovis*. (A) Parênquima testicular à ultrassonografia; ponta de seta ó mediastino; seta ó imagens hiperecóticas geradas por pontos de fibrose no parênquima. (B) Parênquima testicular à necropsia; Seta ó pontos de fibrose no parênquima testicular visualizados no exame *post mortem*. **24**
- Figura 4.** Área testicular em mm^2 de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. As linhas representam média e as barras verticais desvio padrão de nove carneiros. Asteriscos indicam diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). **24**
- Figura 5.** Área em mm^2 da cauda do epidídimo de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. As linhas representam média e as barras verticais desvio padrão de nove carneiros. Asteriscos indicam diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). **25**
-

LISTA DE FIGURAS

- Figura 6.** Características clínicas, ultrassonográficas e macroscópicas do granuloma espermático da cauda do epidídimo de um carneiro experimentalmente infectado com *Brucella ovis* aos 180 dias pós-infecção (Carneiro 3). Figura A ó Aumento da cauda do epidídimo; B ó Imagem ultrassonográfica de um nódulo hiperecótico e nódulo anecótico na cauda do epidídimo aumentada, Ultrasson Chison Vet 500, sonda linear de 5 MHz ; C - Cauda do epidídimo na necropsia; D ó Aspecto cremoso e amarelado do conteúdo do nódulo anecótico visto na ultrassonografia à necropsia. **27**
- Figura 7.** Profundidade e comprimento das vesículas seminais de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. As linhas representam média e as barras desvio padrão de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo pré-infecção, (* $p < 0,001$). **28**
- Figura 8.** Volume do ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa média e as barras verticais o desvio padrão de nove carneiros. **32**
- Figura 9.** Turbilhonamento do ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média de nove carneiros. **32**
- .
- Figura 10.** Porcentagem de espermatozóides móveis no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $p < 0,05$). **32**
- Figura 11.** Vigor dos espermatozóides do ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa média de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $p < 0,05$). **33**
-

LISTA DE FIGURAS

- Figura 12.** Concentração de espermatozóides no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa média e as barras verticais desvio padrão de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* p<0,05). **33**
- Figura 13.** Total de espermatozóides móveis no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média e as barras verticais o desvio padrão de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* p<0,05). **34**
- Figura 14.** Porcentagem de defeitos totais encontrados no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em relação ao período de pré-infecção (* p<0,05). **36**
- Figura 15.** Intensa quantidade de células inflamatórias no ejaculado do carneiro número 3, com epididimite e vesiculite causadas pela infecção experimental com *Brucella ovis*. Figura A ó Células inflamatórias representadas pelos pontos basofílicos. Coloração por panótico rápido; 1,25X; B - Células inflamatórias com predomínio de neutrófilos. Coloração por panótico rápido; 100X. **37**
- Figura 16.** Vesiculite no carneiro número 3 causada pela infecção experimental com *Brucella ovis*. A - Áreas de hiper-celularidade (infiltrado inflamatório) multifocal no interstício e na luz luminal. H.E. 1,25X; B ó acúmulo intraluminal de neutrófilos e infiltrado inflamatório intersticial linfohistioplasmocitário H.E. 100X. **37**
- Figura 17.** Epididimite na da cauda do epidídimo de um carneiro experimentalmente infectado com *Brucella ovis* (carneiro 3). A - áreas de hiper-celularidade no interstício e vacuolização do epitélio H.E. 1,25X, B ó formação de granuloma espermático com de células gigantes na periferia H.E. 100X. **38**
-

RESUMO

A *Brucella ovis* é considerado o principal agente causador de distúrbios reprodutivos em ovinos, sendo a doença caracterizada por epididimite, sub-fertilidade e infertilidade em carneiros e, ocasionalmente, aborto em ovelhas. Os aspectos clínicos da doença têm sido verificados, porém as características do parênquima dos órgãos afetados somente têm sido estudadas através da histologia. As correlações entre os sinais clínicos da doença e as características seminais dos animais afetados têm sido descrita, na maioria das vezes, em animais naturalmente infectados, impossibilitando a avaliação do tempo de infecção. Além disto, a ultrassonografia em tempo real tem se mostrado uma ferramenta válida para o estudo da fisiologia e das patologias do sistema reprodutor dos machos de várias espécies inclusive a ovina. Considerando os poucos estudos da cinética das alterações durante a infecção experimental com *B. ovis* em um período de tempo conhecido e as correlações das alterações ultrassonográficas no parênquima dos órgãos do sistema genital dos ovinos com as alterações clínicas, características seminais e os achados histológicos nestes órgãos foram avaliados neste trabalho. Nove carneiros foram infectados com 2 mL de solução contendo $1,2 \times 10^9$ UFC/mL de *B. ovis* cepa ATCC25840 por via intraprepucial e 50 L em ambos os sacos conjuntivais de solução contendo $1,2 \times 10^{10}$ UFC da mesma cepa. Dos nove animais infectados, seis apresentaram alterações clínicas como aumento de volume e sensibilidade da cauda do epidídimo aos 30 dias após a inoculação. Porém, 50% destes sofreram regressão do quadro a partir dos 60 dias pós infecção. Na ultrassonografia, observou-se aumento na área da cauda do epidídimo ($p < 0,001$), diminuição da área dos testículos ($P < 0,001$), e aumento do comprimento e profundidade das vesículas seminais ($P < 0,001$). Histologicamente, constatou-se epididimite, vesiculite e degeneração testicular, confirmando as alterações clínicas e ultrassonográficas observadas durante o período experimental. Alterações de ecogenicidade foram encontradas na cauda do epidídimo, onde, em um dos carneiros, pode ser visto e acompanhado a dinâmica de crescimento de um nódulo anecóico que, posteriormente, na histologia foi confirmado como granuloma espermático. Células inflamatórias foram encontradas nos ejaculados dos carneiros assintomáticos ao exame físico dos testículos e epidídimos e nos sintomáticos mesmo antes do desenvolvimento da epididimite, indicando que a presença de leucócitos no ejaculado pode ser um método de rastreamento de possíveis carneiros portadores de doenças infecciosas no sistema genital.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, epididimite, vesiculite, ultrassonografia.

ABSTRACT

Brucella ovis is considered the most important infectious cause of reproductive disorders in sheep. The disease is characterized by epididymitis, sub-fertility and infertility in rams and occasionally abortion in ewes. Although clinical aspects of the disease have been studied, changes in the parenchyma of affected organs have only been evaluated by histology, and the correlations between clinical signs and seminal features of the affected rams have been described mostly in naturally infected rams, when it is not possible to assess the time course of infection. Moreover, real-time ultrasonography has proved to be a valuable tool for studying the physiology and pathology of the male reproductive system of several species including sheep. Considering the few studies evaluating the kinetics of disease during infection with *B. ovis* in known time-points post infection, and the correlation of ultrasonographic changes in the parenchyma of the organs of the genital tract of sheep with seminal parameters and histological findings in these organs was evaluated in this study aiming to assess the kinetics of changes in rams experimentally infected with *B. ovis*. Nine rams were infected with 2 mL of 1.2×10^9 CFU/mL of *B. ovis* strain ATCC25840 intraprepuccially, and 50 mL of a suspension containing 1.2×10^{10} CFU of the same strain in both conjunctival sacs. Six out of nine infected rams developed clinical changes in the tail of the epididymis 30 days after inoculation, but these changes regressed in 50% of these rams. The ultrasound demonstrated an increase in area of the tail of the epididymis ($p < 0.001$), reduction in the area of the testes ($p < 0.001$), and an increased length and depth of the seminal vesicles ($p < 0.001$). Microscopically, there was epididymitis, testicular degeneration, and vesiculitis that confirmed the clinical and ultrasonographic findings. Changes in the echogenicity were found tail of the epididymis of one of the rams, where there was an anechoic nodule that was subsequently confirmed to be a sperm granuloma based on histology. Inflammatory cells were found in semen of symptomatic rams even before the development of epididymitis as well as in asymptomatic rams, indicating that the presence of leukocytes in the ejaculate is a valuable method for screening potential carriers of infections in the genital tract.

Keywords: *Brucella ovis*, epididymitis, vesiculitis, ultrasound.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem ocorrido uma expansão significativa da ovinocultura no Brasil, particularmente nas regiões Sudeste e Centro-oeste. Contudo, este crescimento tem ocorrido de forma desordenada sob o ponto de vista da importação de animais de diversas partes do mundo (principalmente Estados Unidos, África e Europa), além do intenso trânsito de pequenos ruminantes no território nacional. Neste cenário, a ausência de legislação sanitária específica trouxe graves consequências, tais como a introdução de doenças anteriormente exóticas nos plantéis nacionais, bem como a disseminação de enfermidades prevalentes nos rebanhos do Nordeste. Tal cenário resultou em perdas e restrições ao comércio internacional de animais e seus produtos, além da disseminação de doenças já tradicionalmente conhecidas no rebanho nacional e a introdução de patógenos anteriormente não encontrados no plantel (Guimarães, 2006).

A partir de 1999, as mudanças na forma de produção de ovinos introduziram novos fatores (animais importados e oriundos de outros estados, agentes patogênicos e novas tecnologias) que culminaram em alterações no perfil sanitário e produtivo dos rebanhos. A epididimite ovina resultante da infecção por *Brucella ovis* está entre os principais problemas sanitários dos rebanhos ovinos e teve o seu primeiro relato no Brasil em 1972 (Blobel et al., 1972, Guimarães, 2006)

O objetivo deste estudo foi verificar o desenvolvimento de alterações nos órgãos do sistema reprodutor dos carneiros experimentalmente infectados com *B. ovis* através de exames ultrassonográficos, e avaliar a dinâmica das lesões macroscópicas e microscópicas dos órgãos do sistema genito-urinário e das características seminais durante o curso de infecção, bem como, correlacionar as características seminais com as alterações ultrassonográficas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Brucella*

A primeira espécie do gênero *Brucella* foi isolada em 1887, por David Bruce, de baço de militares que morreram na costa do Mediterrâneo acometidos pela doença conhecida como Febre de Malta. O organismo foi denominado de *Micrococcus melitensis* e, mais tarde, renomeado como *Brucella melitensis*, em homenagem ao Dr. Bruce. Dez anos mais tarde, um veterinário holandês, chamado Bang, isolou a *Brucella abortus* de um feto bovino abortado. Posteriormente, a *Brucella suis* foi isolada em 1914, por Jacob Traum, de um leitão abortado, a *Brucella neotomae* foi isolada em 1957, por Stoenner, nos Estados Unidos da América de roedores do deserto e a *Brucella canis* foi descrita por Carmichael em 1969 acometendo cães (Xavier et al., 2009).

A *Brucella ovis* foi isolada pela primeira vez em 1952, por McFarlane e colaboradores, na nova Zelândia. A *B. ovis* é um cocobacilo Gram-negativo, não encapsulado, não forma esporos, com um tamanho de 0,5 a 0,7 por 0,7 a 1,2 μ m. Pode ser corada pela técnica de coloração de Stamp ou de Köster. *Brucella* spp. pode ser lisas ou rugosas dependendo da presença ou ausência da cadeia O do polissacarídeo. A *B. ovis* não possui a cadeia O de polissacarídeo e, portanto, é considerada naturalmente rugosa (Xavier et al., 2009).

Além das espécies clássicas de *Brucella* spp., recentemente foram identificadas novas espécies isoladas de mamíferos marinhos, a *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis* (Jahans et al., 1997; Cloeckaert et al., 2003). Há relato de um caso de infecção acidental em laboratório (Brew et al., 1999) e dois casos de infecção natural com amostras de *Brucella* oriundas de mamíferos marinhos que resultaram em alterações neurológicas em pacientes humanos (Shon et al., 2003). Outras novas espécies de *Brucella* acometem mamíferos terrestres, como a *Brucella microti* que foi isolada de roedores (*Microtus arvalis*) (Scholz et al., 2008) e *Brucella inopinata*, isolada de paciente humano (Scholz et al.,

2010). Recentemente, uma nova espécie de *Brucella* ainda não classificada, foi isolada de fêmeas de babuínos (Loutsevitch et al., 2009).

2.2 Epididimite ovina causada por *Brucella ovis*

O termo epididimite ovina tem sido usado para se referir a infecção por *Brucella ovis*, embora outros agentes como o *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus somni* e *Arcanobacterium pyogenes* também possam causar alterações clínicas semelhantes àquelas causadas por *B. ovis*. A brucelose ovina pode ser causada pela *B. ovis* ou *B. melitensis*. Contudo, a *B. ovis* não é zoonótica, ao contrário da *B. melitensis*, que é a espécie do gênero *Brucella* com maior potencial zoonótico (Xavier et al., 2009).

A *Brucella* sp. é um organismo intracelular facultativo, que afeta várias espécies de mamíferos (Celli et al., 2003). A infecção por *B. ovis* é contagiosa causando uma enfermidade de evolução crônica. Naturalmente, acomete a espécie ovina provocando inflamação do epidídimo com a diminuição da fertilidade, e ocasionalmente, abortamento nas fêmeas e aumento da mortalidade perinatal (Ficapal et al., 1998; OIE, 2000). Entre outras espécies consideradas susceptíveis a infecção por *B. ovis*, estão os cervídeos, *Cervus elaphus* e *Odocoileus virginianus*, sendo que o primeiro pode apresentar alterações seminais (Barron et al., 1985; Ridler & West, 2002).

A enfermidade ocorre na maioria dos países que possuem rebanhos ovinos (OIE, 2000). Na Nova Zelândia, McFarlane (1952) descreveu casos de aborto e epididimite causados por *B. ovis* em ovinos. Na Austrália, entre 30 carneiros estudados, nove apresentaram infecção por *B. ovis* (Simmons & Hall, 1953). Em estudo feito por Robles (1998), durante três anos na Argentina, a porcentagem de animais com sinais clínicos no primeiro, segundo e terceiro ano de estudo foi de 3,8%, 6,45% e 2,3%, respectivamente, enquanto que, a prevalência sorológica foi de 2,1%, 4% e 6,3% no mesmo período. Estes dados mostram a grande variação nos sinais

clínicos desta doença. Nos Estados Unidos, Bagley e colaboradores (1985) encontraram 23% dos animais clinicamente afetados pela epididimite e no Canadá 8,6% dos rebanhos testados pelo método de fixação de complemento (FC) tinham animais soropositivos (Nilo et al., 1986).

No Brasil, o primeiro isolamento da bactéria ocorreu em 1972 no estado do Rio Grande do Sul (Blobel et al., 1972). Magalhães Neto & Turnes (1996), estudaram 1.638 animais de 76 rebanhos do Rio Grande do Sul e encontraram 9,8% de animais positivos usando técnica de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) e entre os animais com epididimite, 13,4 % foram positivos para *B. ovis*. Em Santa Catarina, Ávila e colaboradores (2003) estudaram 95 animais de 23 rebanhos oriundos de 13 municípios e não encontraram animais positivos para *B. ovis*. No Estado do Rio Grande do Norte, foram examinados 115 animais provenientes de 11 rebanhos situados em quatro municípios, dos quais, 13 (11,3%) apresentaram anticorpos anti-*B. ovis* no IDGA (Azevedo et al., 2004). No estado de São Paulo, Nozaki e colaboradores (2004) encontraram 12% de amostras positivas pelo método de IDGA em 1.033 animais estudados. No Estado de Minas Gerais, Marques (2006) encontrou prevalência de 5,3% de animais positivos em 833 testados, sendo que a região de Minas Gerais que mais apresentou animais positivos foi a sul/sudeste com 18 amostras positivas de 190 testadas. Clementino e colaboradores (2007) encontraram evidências sorológicas em 8,5% dos rebanhos estudados no Estado da Paraíba.

As lesões causadas por *B. ovis* estão praticamente restritas ao sistema genital (Buckrell, 1985). Segundo Swift & Weyerts (1969), Biberstein e colaboradores (1962) e Walker e colaboradores (1986), as lesões causadas por *B. ovis* são comumente encontradas no epidídimo. A epididimite causada pela *B. ovis* geralmente é unilateral e acomete a cauda do epidídimo podendo atingir também o corpo e a cabeça do órgão (Walker et al., 1986; Ficapal et al., 1998). A infecção causa edema perivascular e infiltração de linfócitos associada à hiperplasia, metaplasia, fibrose e obstrução

do ducto epididimário, levando a retenção do conteúdo. As lesões secundárias dependem do extravasamento do espermatozóide, promovendo inflamação crônica, fibrose difusa e a formação de granuloma espermático.

As lesões testiculares são sempre secundárias as do epidídimo. A atrofia testicular é mais comum e acentuada nos casos com aderência (Biberstein et al., 1964; Swift & Weyerts, 1969). Podem ocorrer também inflamação e edema da vesícula seminal que se apresenta aumentada de volume. A vesícula seminal pode estar infectada enquanto o epidídimo está livre de lesões e bactérias, sugerindo que a *B. ovis* também têm um tropismo pela vesícula seminal (Biberstein et al., 1964).

A doença acomete principalmente animais adultos e a transmissão ocorre pelo contato direto entre carneiros, favorecida pelo comportamento homossexual comum nesta espécie. A fêmea participa da transmissão como um vetor mecânico, quando coberta por dois ou mais machos no mesmo ciclo estral, e o primeiro está contaminado pela *B. ovis* os demais podem se infectar. Depois de estabelecida a infecção, esta se torna crônica ou subclínica (Santos et al., 2005).

A epididimite é considerada uma doença de grande impacto econômico, pois afeta a fertilidade do rebanho (Walker et al., 1986). As perdas econômicas mais frequentes são menor número de ovelhas por carneiro, abortamento, aumento na taxa de mortalidade neonatal em consequência do baixo peso ao nascimento, menor número de animais produzidos e descarte precoce de animais (McFarlane et al., 1952; Biberstein et al., 1962; Walker et al., 1986; Carpenter et al., 1987; Magalhães Neto & Turnes 1996; Robles 1998; Cerri et al., 2002; Santos et al., 2005).

2.3 Diagnóstico por ultrassonografia

O diagnóstico definitivo da doença pode ser feito através de métodos laboratoriais como sorologia, isolamento bacteriano e PCR (Xavier et al., 2009). O diagnóstico clínico presuntivo da infecção é feito pela identificação das lesões causadas pela *B.*

ovis através do exame clínico por inspeção, palpação e ultrassonografia dos testículos e epidídimos do animal acometido. A ultrassonografia é um método de diagnóstico auxiliar que pode aumentar a acurácia do exame clínico (Robles, 1998; Gouletsou et al., 2003; Xavier, 2009).

A ultrassonografia em tempo real é uma técnica de imagem na qual a identificação e fisiologia dos tecidos, assim como, o diagnóstico de condições patológicas são realizados de forma dinâmica através da reconstituição anatômica seccional dos órgãos estudados. A técnica ser usada para detecção de patologias causadoras de infertilidade tanto na fêmea quanto nos machos facilitando o diagnóstico e tratamento (Cruz & Freitas 2001).

O equipamento mais frequentemente empregado em reprodução animal tem por princípio o B-mode (*brighness modality*) em tempo real. O exame ultrassonográfico é uma técnica não invasiva, não destrutiva capaz de obter diretamente imagem *in situ*, da anatomia interna ou externa dos órgãos e tecidos do aparelho reprodutivo e caracteriza os eventos neles ocorridos. Esta técnica permite uma frequente ou contínua avaliação de animais em individual, e permite o estudo sequencial das relações entre as estruturas, com aplicações na clínica e na investigação científica (Griffin & Ginter 1992).

Na ultrassonografia em tempo real B-mode, a disposição dos pontos de luz (pixels) são bidimensionais. O brilho dos pontos de luz é proporcional à amplitude do eco refletido que retorna ao transdutor e o termo em tempo real, refere-se à possibilidade da análise da imagem em movimento (Griffin & Ginter 1992).

O principal obstáculo para a utilização da ultrassonografia no diagnóstico andrológico veterinário tem sido a pouca quantidade de informações sobre os parâmetros normais da anatomia testicular das espécies domésticas, assim como, a ausência de estudos de correlação entre as lesões reveladas pelas imagens ultrassonográficas e o atual estágio da lesão (Griffin & Ginter, 1992).

Ahmad & Noakes (1995) utilizaram a ultrassonografia para o estudo de lesões em testículos e epidídimos de caprinos e ovinos. Um estudo feito com testículos e epidídimos de carneiros sadios demonstrou que o emprego da técnica aumenta a precisão do exame feito no sistema genital destes animais, por permitir a detecção de anormalidades presentes nos testículos e epidídimos (Gouletsou et al., 2003).

O estabelecimento dos parâmetros ultrassonográficos para as dimensões testiculares e caracterização da morfologia ultrassonográfica normal são necessários para permitir investigações e estudos dos processos degenerativos que acometem o testículo (Coulter & Bailey 1988). A ultrassonografia testicular comprovadamente não causa danos às células espermáticas, uma vez que a exposição ao exame de ultrassom com transdutor de 5,0 MHz, durante três minutos, não apresentou nenhum efeito sobre a capacidade reprodutiva de touros (Coulter & Bailey 1988).

A técnica de ultrassonografia trans-retal tem sido usada em estudos visando mensuração das glândulas vesiculares, próstata, ampola e glândulas bulbouretrais. Em Touros, a mensuração através de ultrassonografia tem sido amplamente usada para estudo das glândulas acessórias (Griffin & Ginter 1992). Além disso, a ultrassonografia tem grande potencial para ser usada no estudo do desenvolvimento e da regulação endócrina e possivelmente predizendo o potencial reprodutivo de touros (Chandolia et al., 1997). Chandolia e colaboradores (1997), usando ultrassonografia transretal em cordeiros em desenvolvimento, demonstraram que a técnica tem grande valor para o estudo das glândulas acessórias, do desenvolvimento dos testículos, facilitando o estudo da regulação endócrina do desenvolvimento do trato reprodutivo dos carneiros. O estudo ultrassonográfico do desenvolvimento testicular tem grande potencial para prever a fertilidade de carneiros (Cartee et al., 1990).

A ultrassonografia tem sido usada no estudo de várias doenças do sistema reprodutivo de diversas espécies incluindo de orquítes e

epididimites em humanos (Cook & Dewbury 2000). Segundo Giffin e colaboradores (2009), a ultrassonografia pode ser utilizada para determinar a precisa correlação entre a ecotextura e a histomorfologia testicular. Um estudo utilizando carneiros experimentalmente infectados com *Arcanobacterium pyogenes* demonstrou que a ultrassonografia é um método útil para constatação de desordens intra-escrotais, especialmente em estágios mais crônicos da doença (Gouletsou et al., 2004). Ahmad & Noakes (1995), estudando testículos e epidídimos de carneiros e bodes com lesões quimicamente induzidas, observaram que a imagem ultrassonográfica auxilia no diagnóstico e no monitoramento de lesões nos testículos e epidídimos. Karaca e colaboradores (1999), estudando granuloma espermático em carneiros, demonstraram que esta lesão pode ter característica ultrassonográfica variada na ecogenicidade e tamanho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Adaptação dos animais

Foram utilizados nove carneiros mestiços da raça Santa Inês, entre um e três anos de idade, mantidos na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais em piquete único e isolados de outros animais. Foram utilizadas duas fêmeas mestiças da raça Santa Inês para auxílio na coleta de amostras de sêmen. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA, protocolo: 02/2007). Os animais foram alimentados com feno e ração comercial para ovinos e submetidos à desverminação (Cydectin injetável, Fort Dodge Animal Health, Iowa, EUA) sempre que necessário, com base na contagem de ovos nas fezes.

3.2 Coleta do sêmen

Durante a fase de adaptação, os animais foram condicionados à coleta de sêmen com a utilização de vagina artificial. Para isso, os machos foram colocados em contato diário com as fêmeas, permitindo a monta e coleta de sêmen, por aproximadamente 15 dias. Para estimular o interesse inicial dos

machos, estro artificial foi induzido alternadamente nas fêmeas, através da aplicação de 1 mL de cipionato de estradiol (ECP ó Pfizer Saúde Animal, Guarulhos, SP, Brasil) 48 horas antes da coleta de sêmen. Este protocolo continuou sendo utilizado durante o período experimental, quando necessário.

Para que a coleta do sêmen fosse realizada da maneira mais asséptica possível, foram utilizados somente equipamentos previamente esterilizados antes da coleta. Durante a coleta para evitar a contaminação cruzada entre os animais foram utilizadas camisas sanitárias no interior da vagina artificial, evitando assim o contato direto do pênis do carneiro com a mucosa da vagina artificial. Foi utilizada uma camisa sanitária para cada animal e esta era descartada após cada coleta. Este procedimento foi adotado no período de adaptação e ao longo do período experimental.

As coletas de sêmen e o exame ultrassonográfico foram realizados no mesmo dia, sendo a primeira coleta realizada antes da inoculação e as demais repetidas à cada 30 dias até 180 dias pós-inoculação. Todas as coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial própria para a espécie e um tubo de centrifuga de fundo cônico de 15 mL acoplado a um funil previamente aquecido entre 42 e 45°C foi utilizado como copo coletor.

3.3 Inoculação

Após o período de adaptação, os animais foram desafiados com 2 mL de suspensão contendo $1,2 \times 10^9$ UFC/mL de *B. ovis* cepa ATCC25840 por via intraprepucial e 50 L de suspensão contendo $1,2 \times 10^{10}$ UFC da mesma cepa, em ambos os sacos conjuntivais, de forma que cada animal recebeu o desafio total de $3,6 \times 10^9$ UFC de *B. ovis* (Blasco, 1990). Antes da inoculação, todos os carneiros foram submetidos à coleta de soro, sangue, sêmen, urina e lavado prepucial com o objetivo de demonstrar a ausência de infecção pré-inoculação.

3.4 Exame clínico

Ao exame clínico, foram avaliados o estado geral do animal, apêndices e as características dos órgãos reprodutivos externos com o animal em estação. Foi verificada a presença de lesões no escroto, prepúcio e pênis. Os testículos e epidídimos foram palpados para verificar a consistência, temperatura, sensibilidade, tamanho, mobilidade no interior da bolsa escrotal, e comparados com os contralaterais. Os cordões espermáticos foram palpados para constatação da normalidade.

Foram mensurados com um paquímetro, dados de comprimento e largura dos testículos e cauda dos epidídimos para aferir qualquer mudança de tamanho nestes órgãos e correlacionar com os achados clínicos e ultrassonográficos. Para mensurar o comprimento testicular, o paquímetro foi colocado na posição dorso-ventral isolando a cabeça e cauda do epidídimo e para mensurar a largura testicular, o paquímetro foi colocado na área central de cada testículo em sua base mais larga no sentido látero-lateral. Os dados de comprimento da cauda dos epidídimos foram obtidos com o paquímetro sobre o órgão no sentido dorso-ventral isolando do testículo. Os dados de largura foram obtidos com o paquímetro na área central da cauda do epidídimo no sentido látero-lateral.

3.5 Avaliação do sêmen

O sêmen coletado foi mantido em banho-maria a 37°C e então avaliado o volume, concentração e morfologia espermática e analisado subjetivamente a motilidade, o vigor e o turbilhonamento espermático. A concentração espermática foi determinada após de diluição do sêmen em solução de formol-salina tamponada na taxa de 1:400 e posterior contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica em aumento de 400X. Para a análise de morfologia espermática, uma amostra do sêmen fresco foi colocada em solução de formol-salina tamponada a 0,9% previamente aquecida a 37°C. A leitura foi realizada pela técnica de preparação úmida, colocando-se uma gota de cada amostra entre lâmina e lamínula, sendo avaliada sob microscopia de contraste

de fase (Olympus, BX-41), em um aumento de 1000X. Foram contadas 100 células por amostra, estabelecendo-se o percentual de normalidades presentes. Uma amostra de sêmen foi coletada para confecção de esfregaço em lâmina e corada por Panótico Rápido para pesquisa de células inflamatórias no ejaculado.

3.6 Exame ultrassonográfico

A avaliação ultrassonográfica foi realizada nos animais após a coleta do sêmen. As imagens ultrassonográficas dos testículos e epidídimos foram obtidas com o carneiro em estação, usando aparelho Chison 500 Vet (Veterinary Ultrasonnd, Chison Medical Imaging. LTD, China), com auxílio de transdutor linear de 5 MHz. Os animais, contidos por dois assistentes, tinham os testículos não prensados, pendentes, porém imobilizados e lubrificados com gel de transmissão ultrassonográfico sobre o qual o transdutor foi aplicado.

Inicialmente, o testículo esquerdo foi digitalizado com a sonda do o transdutor no sentido transversal. A sonda foi colocada na superfície testicular no sentido caudo-cranial, em seguida, movida no sentido dorso-ventral digitalizando todo testículo e observando o parênquima, mediastino, a altura e profundidade do órgão na área correspondente à maior circunferência do escroto. Feito isto, a sonda foi colocada na mesma posição na cauda, corpo e cabeça do epidídimo esquerdo onde foram obtidas informações sobre altura e profundidade, bem como, presença de lesões e suas mensurações nos momentos previstos. O mesmo processo foi realizado no testículo e epidídimo direitos.

Para obter imagens das glândulas vesiculares, as fezes foram removidas do reto que foi lubrificado com gel de transmissão do ultrassom. A altura e profundidade das glândulas vesiculares foram mensuradas com auxílio de transdutor linear de 5 MHz acoplado a um cano plástico flexível de ½ polegada com adesiva.

3.7 Histopatologia

A avaliação histopatológica de possíveis lesões caudadas pela *B. ovis* nos órgãos dos animais foi realizada aos 192 dias pós-infecção. Os animais foram sedados com Xilazina na dose de 1,5 ml para cada 100 kg de peso vivo (Copazine, Schering-Plough Coopers, Cotia, Brasil), eutanasiados por eletrocussão e submetidos à necropsia. Foram coletados fragmentos de cauda, corpo e cabeça de ambos os epidídimos, ambos os testículos, ampola do ducto deferente, vesículas seminais, glândulas bulbo-uretrais, prepúcio, glândula, linfonodos inguinais, linfonodos ilíaco-internos, baço, fígado, rins e bexiga. Os tecidos foram fixados por imersão em formalina tamponada e solução de Bouin (testículos) e processadas para exame histopatológico, segundo as técnicas rotineiras de inclusão em parafina, e corados pela hematoxilina e eosina.

3.8 Morfometria e proporção volumétrica

A morfometria e a contagem diferencial das células do epitélio seminífero foram realizadas utilizando os mesmos fragmentos processados para histopatologia de acordo com a técnica descrita por Santos e colaboradores em 1999. Como grupo referência, foi utilizado cortes de ambos os testículos de nove carneiros soronegativos para *B. ovis*, com idade entre dois e três anos, coletados em abatedouro, sem alterações macroscópicas.

A fase do epitélio seminífero foi classificada de acordo com a forma e a posição dos núcleos de espermatídes e da presença de divisões meióticas. A população celular do epitélio seminífero foi estimada pela contagem dos núcleos de diferentes tipos de células germinativas, bem como células de Sertoli. Foram contados 20 secções transversais de túbulos no estágio 1 do ciclo para cada animal de acordo com Santos et al., 1999. Apenas as secções transversais que estão quase circulares foram utilizadas para a contagem de células. Os seguintes tipos celulares foram identificados e contados: espermatogônia, espermatócito preleptoteno, espermatócitos paquíteno, espermatídes arredondadas e células Sertoli.

O diâmetro tubular foi medido em 20 túbulos selecionados aleatoriamente em cada testículo. Essas seções eram circulares e correspondia a túbulos na fase 1 do ciclo do epitélio seminífero. A mesma abordagem foi utilizada para medir a altura do epitélio seminífero em dois pontos distintos do mesmo túbulo, e os resultados foram expressos como a média dessas duas medidas. Estas medidas foram obtidas com auxílio de uma lente ocular micrométrica e usando a lente objetiva 40X.

Proporções volumétricas dos componentes estruturais testiculares foram avaliadas através de uma grade ocular com 25 pontos (Zeiss KPL, Alemanha) e lente objetiva de 10 x. A grade foi sobreposta a 40 campos microscópicos escolhidos aleatoriamente, totalizando 1000 pontos por órgão. Foi obtida a proporção volumétrica dos seguintes elementos estruturais: interstício, túbulos, epitélio seminífero e lúmen tubular.

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad InStat software versão 3.05 (GraphPad InStat software, Inc. San Diego, CA, EUA), considerando-se diferenças significativas quando o $p < 0,05$. As variáveis quantitativas com distribuição normal foram submetidas ao teste de Student Newman Kews (SNK), e as que não apresentaram distribuição normal

foram submetidas à transformação angular e posteriormente analisadas pelo teste de SNK. As correlações das variáveis com distribuição normal foram submetidas ao teste de Pearson. As variáveis não-paramétricas foram submetidas ao teste de Kruskal Wallis e as correlações entre estas variáveis submetidas ao teste de Spearman (Sampaio, 2002).

4. RESULTADOS

No período que precedeu a infecção, os nove carneiros não apresentaram nenhuma alteração clínica ou ultrassonográfica nos testículos e epidídimos. As mensurações realizadas através de paquímetro e ultrassonografia dos testículos e epidídimos e as medidas ultrassonográficas da vesícula seminal estão detalhadas na Tabela 1. Os ejaculados de todos os carneiros apresentaram características dentro dos padrões considerados normais de acordo com o Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). As médias e os desvios padrão dos ejaculados avaliados imediatamente após a coleta no período pré-infecção estão detalhados na Tabela 2. Todos os animais foram negativos para *Brucella ovis* no período pré infecção pelos métodos sorológicos de IDGA e FC e também na bacteriologia e PCR de sêmen, urina e lavado prepucial.

Tabela 1. Biometria dos testículos e da cauda do epidídimo. Média e desvio padrão (dp) dos nove carneiros avaliados antes da infecção por *Brucella ovis*.

Característica	Média ± dp	Amplitude de variação
Circunferência escrotal (cm)	29,11 ± 1,83	27,00 - 31,00
Consistência (0-5)	3,78 ± 0,44	3,00 - 4,00
Paquímetro		
Largura testículo direito (cm)	5,53 ± 0,60	5,00 - 6,50
Largura testículo esquerdo (cm)	5,80 ± 0,50	5,00 - 6,50
Altura testículo direito (cm)	9,41 ± 0,62	8,50 - 10,00
Altura testículo esquerdo (cm)	8,90 ± 0,43	8,30 - 9,10
Largura cauda do epidídimo direito (cm)	2,48 ± 0,23	2,00 - 2,70
Largura cauda do epidídimo esquerdo (cm)	2,34 ± 0,26	2,00 - 2,90
Altura cauda do epidídimo direito (cm)	2,81 ± 0,34	2,30 - 3,20
Altura cauda do epidídimo esquerdo (cm)	2,60 ± 0,33	2,00 - 3,00
Ultrassom		
Área testículo direito (mm ²)	54,11 ± 4,50	49,50 - 64,00
Área testículo esquerdo (mm ²)	54,28 ± 5,21	50,50 - 67,50
Área cauda do epidídimo direito (mm ²)	22,20 ± 2,46	17,00 - 26,00
Área cauda do epidídimo esquerdo (mm ²)	23,06 ± 1,78	19,50 - 25,50
Comprimento da vesícula seminal (mm)	9,78 ± 0,63	9,44 ó 15,33
Profundidade da vesícula seminal (mm)	5,00 ± 1,05	3,89 ó 8,56

Tabela 2. Características dos ejaculados avaliados imediatamente após a coleta. Média e desvio padrão (dp) dos nove carneiros avaliados antes da infecção por *Brucella ovis*.

Característica	Média +/- dp	Amplitude de variação
Volume (mL)	0,76 ± 0,19	0,20 ó 1,00
Motilidade total (%)	73,33 ± 11,18	50,00 - 80,00
Vigor (0-5)	4,00 ± 0,00	4,00
Turbilhonamento (0-5)	4,11 ± 0,60	3,00 - 5,00
Concentração (x 10 ⁹ spz/mL)	6,08 ± 2,63	3,20 - 8,36
Total de spz móveis (10 ⁹ spz/ejaculado)	3,60 ± 2,00	1,10 - 6,40
Morfologia espermática		
Cabeça isolada (%)	2,00 ± 0,00	2,00
Cauda dobrada (%)	3,67 ± 4,18	0,00 - 10,00
Cauda dobrada com gota (%)	0,00 ± 0,00	0,00
Cauda enrolada (%)	5,75 ± 3,69	0,00 - 10,00
Defeito na peça intermediária (%)	1,00 ± 0,00	0,00 1,00
Gota distal (%)	6,67 ± 9,14	0,00 - 25,00
Gota proximal (%)	4,50 ± 3,54	0,00 - 7,00
Defeitos totais (%)	15,22 ± 8,70	4,00 - 35,00

Após a inoculação dos carneiros com *B. ovis*, foram feitas coletas de urina, lavado prepucial e sêmen para exames de PCR e bacteriologia. Combinando os resultados de bacteriologia e PCR de urina, lavado prepucial e sêmen, todos os animais foram positivos para *B. ovis*. Aos 30 dias após infecção, 8 dos 9 carneiros foram sorologicamente positivos para *B. ovis* pelo método de IDGA e todos os carneiros foram positivos pelo método de FC (Xavier et al., 2009).

Os testículos e epidídimos apresentaram alterações clínicas após a inoculação de *B.*

ovis. A consistência testicular diminuiu em sete dos nove carneiros, aos 30 dias pós-infecção, e nos outros dois animais somente aos 120 dias pós-infecção, se mantendo assim até o final do período experimental (Figura 1). A circunferência escrotal diminuiu aos 30 dias após a infecção, porém aos 60 dias pós-infecção retornou aos valores apresentados na pré-infecção (Figura 2). As mensurações efetuadas através do paquímetro mostraram redução apenas na largura do testículo esquerdo, sendo que as demais mensurações nos testículos não apresentaram alterações significativas (Tabela 3).

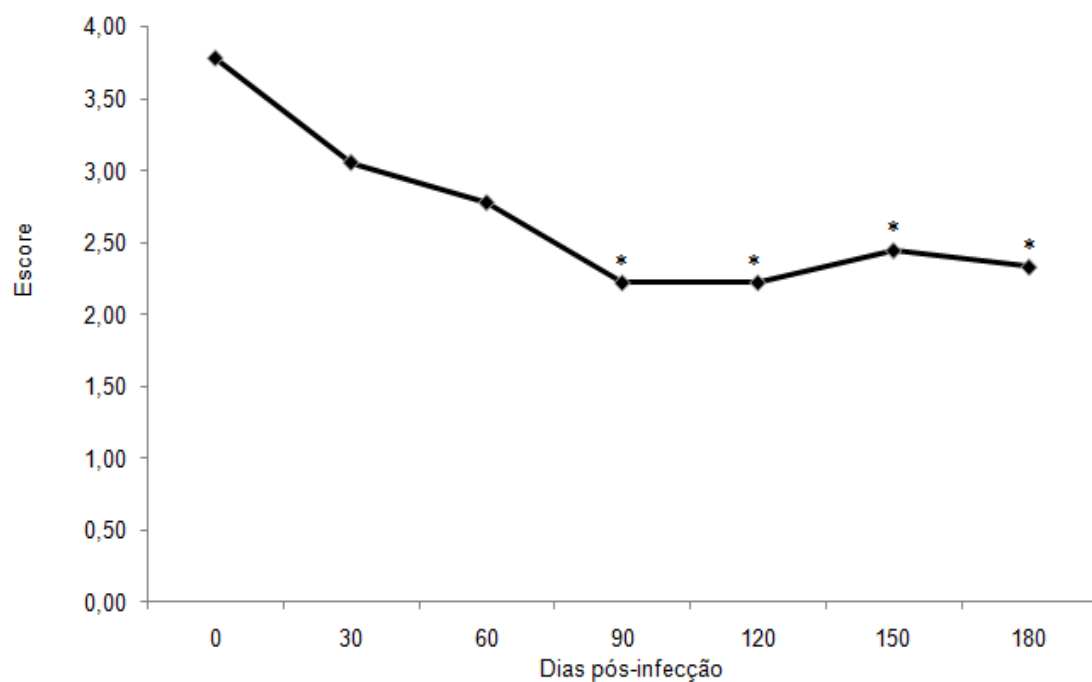


Figura 1. Consistência testicular de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $p < 0,05$).

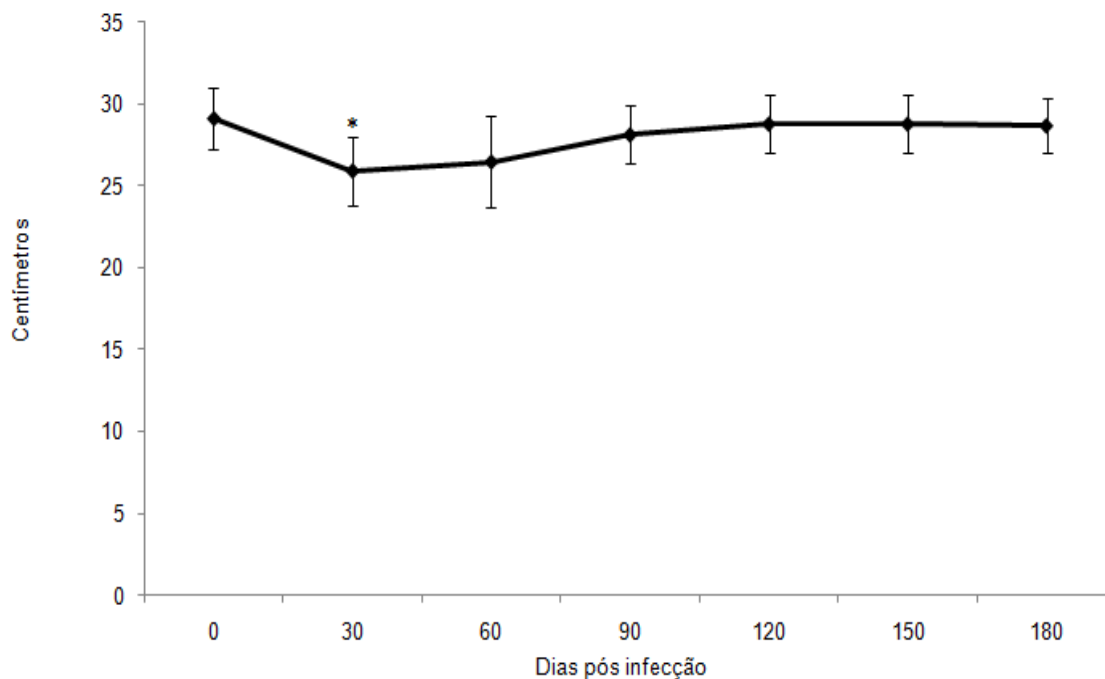


Figura 2. Circunferência escrotal de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média e as barras verticais o desvio padrão de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $P < 0,05$).

Na ultrassonografia, o parênquima testicular apresentou-se homogêneo, com ecogenicidade variando de média a alta. Em algumas áreas, o parênquima testicular de seis dos nove carneiros apresentou pontos hiperecóticos no período pré-inoculação e durante todo o período experimental (Figura 3-A). Segundo Barth e colaboradores, (2007), estes pontos hiperecóticos são áreas de fibrose no parênquima testicular, sendo que em quatro dos seis carneiros afetados,

esta alteração foi bilateral e nos outros dois carneiros a alteração foi unilateral (Figura 3-B). O mediastino (*mediastinum testis*) foi visualizado em todos os carneiros, localizado no centro do parênquima testicular. As mensurações realizadas através de ultrassonografia mostraram uma redução da área de ambos os testículos entre 30 e 90 dias pós-inoculação e a partir deste período as medidas assumiram valores próximos ao inicial (Figura 4).

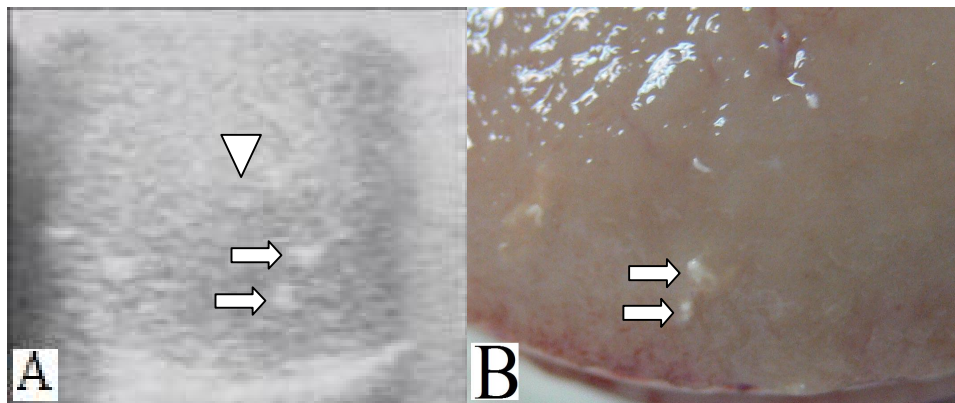


Figura 3. Imagens ultrassonográfica e macroscópica do parênquima testicular de um carneiro após 180 dias de infecção experimental com *B. ovis*. (A) Parênquima testicular à ultrassonografia; ponta de seta ó mediastino; seta ó imagens hiperecóticas geradas por pontos de fibrose no parênquima. (B) Parênquima testicular à necropsia; Seta ó pontos de fibrose no parênquima testicular visualizados no exame *post mortem*.

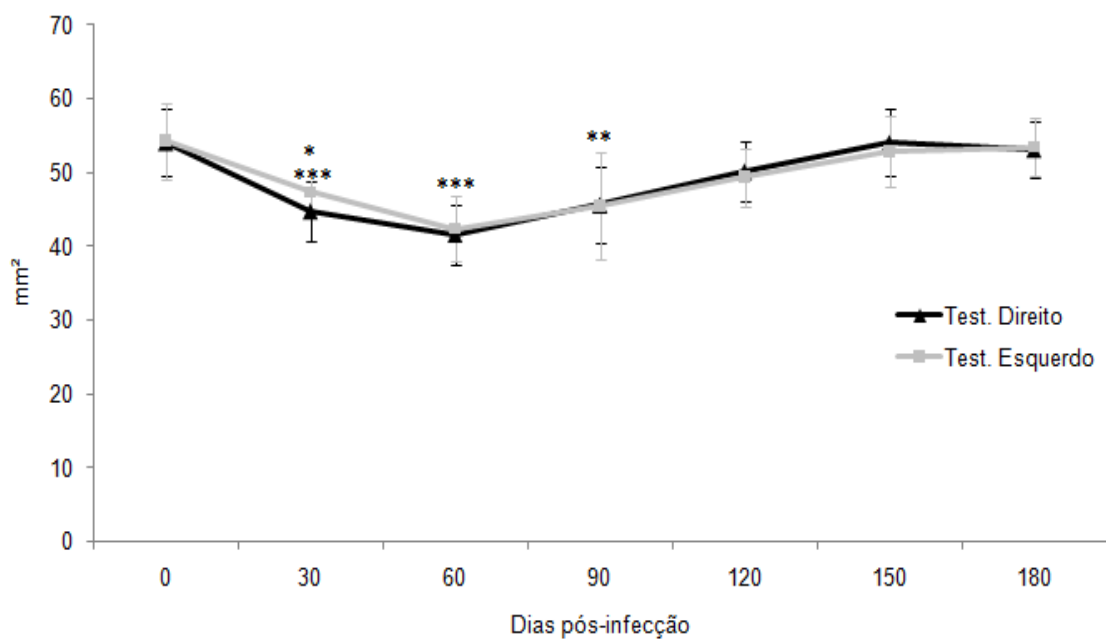


Figura 4. Área testicular em mm² de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. As linhas representam média e as barras verticais desvio padrão de nove carneiros. Asteriscos indicam diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001).

Nas medidas ultrassonográficas, as caudas dos epidídimos apresentaram aumento bilateral de suas áreas aos 150 dias pós-infecção, o epidídimo direito manteve este aumento até o fim do período experimental,

enquanto o epidídimo esquerdo retornou a medida de área semelhante à mensurada antes da infecção, aos 180 dias pós-infecção (Figura 5).

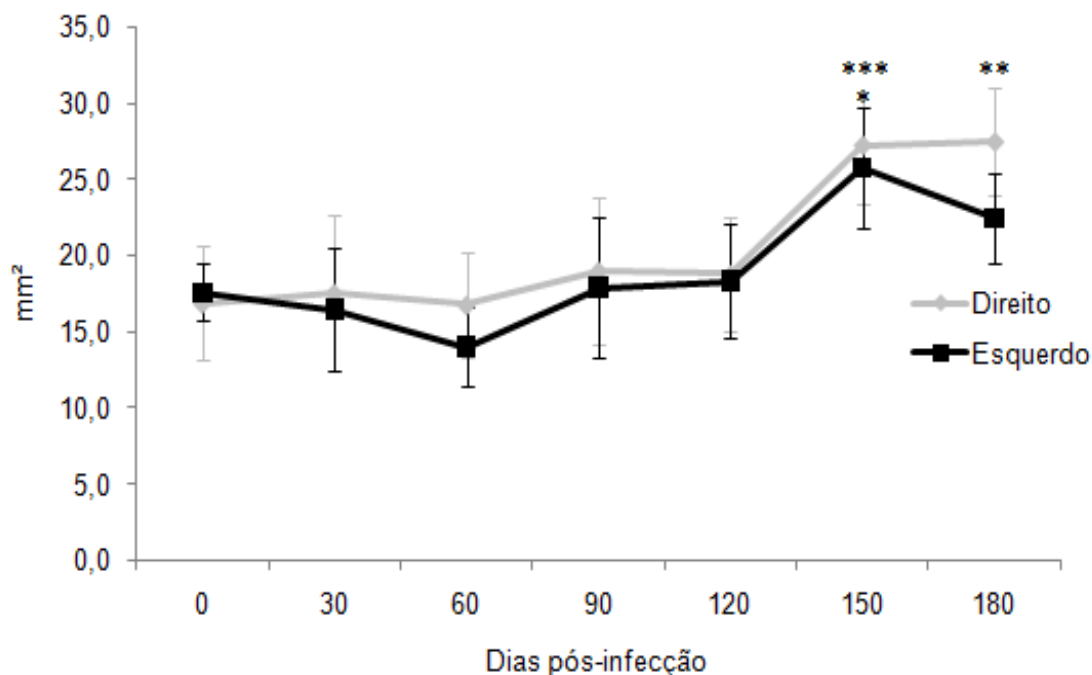


Figura 5. Área em mm² da cauda do epidídimo de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. As linhas representam média e as barras verticais desvio padrão de nove carneiros. Asteriscos indicam diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001).

As caudas dos epidídimos apresentaram um aumento bilateral de comprimento, sendo que no epidídimo direito, aos 30 dias pós-inoculação, cinco carneiros apresentaram aumento do comprimento da cauda do epidídimo, dois aos 90 dias, um aos 120 dias e o último aos 180 dias pós-infecção. O aumento do comprimento da cauda do epidídimo esquerdo ocorreu em quatro animais aos 30 dias pós-inoculação, em dois aos 60 dias, em dois aos 90 dias e em um aos 120 dias pós-inoculação. Aos 120 dias pós-infecção, o comprimento da cauda do epidídimo esquerdo foi estatisticamente maior que no período pré-inoculação e aos 150 dias na cauda do epidídimo direito, se mantendo assim até o fim do período experimental. Os testículos não apresentaram diferença na largura quando mensurados com o paquímetro (Tabela 3).

Clinicamente, 66,7% (6/9) dos carneiros apresentaram alterações aos 30 dias pós-infecção nos epidídimos, sendo que destes, 83,3% (5/6) apresentaram alterações unilaterais e um dos carneiros apresentou alterações bilaterais. As alterações clínicas

foram caracterizadas por aumento de volume e consistência (Tabela 4). Um aumento da sensibilidade à palpação foi observado na cauda do epidídimo em quatro dos seis carneiros (dois do lado direito, um do lado esquerdo e o outro bilateralmente). Foram encontrados nódulos palpáveis em dois carneiros, sendo que em um estava localizado na cauda do epidídimo direito e no outro localizado na cauda do epidídimo esquerdo. Aos 60 dias pós-infecção, dois dos seis animais mantiveram as alterações anteriormente apresentadas na cauda dos epidídimos. Em um deles foi detectado, além do aumento do volume, um nódulo palpável nesta mesma cauda (Figura 6A). Dos três animais que não haviam apresentado alterações aos 30 dias de infecção, em um foi observado um aumento de volume e consistência da cauda do epidídimo direito. Após este período não ocorreram mais alterações clínicas nos animais acometidos.

A ultrassonografia, a cauda do epidídimo apresentou ecogenicidade menor que o parênquima testicular, heterogênea e bem

delimitada no período pré e pós-infecção. Todas as alterações de volume nas caudas dos epidídimos foram passíveis de mensuração através da ultrassonografia. Alterações no parênquima epididimário foram notadas em três de nove animais. As caudas do epidídimo de dois destes animais apresentaram alterações de ecogenicidade discretas, sendo que em um destes carneiros foi detectado um nódulo anecóico com área de 3 mm² sem alteração de volume do órgão, e no outro foi detectado nódulos anecóicos bilaterais com área de 2 mm², ambos aos 60 dias pós-infecção (Tabela 4).

A alteração ultrassonográfica mais significativa foi detectada em um dos carneiros (carneiro 3) aos 30 dias pós-infecção, quando no parênquima da cauda do epidídimo direito foi visto um nódulo anecóico com margens bem definidas de 112

mm². Aos 60 dias pós-infecção, este nódulo tinha uma área de 78 mm², reduzindo para 25 mm² aos 90 dias pós-infecção. Aos 90 dias pós-infecção este carneiro apresentava um nódulo palpável na cauda do epidídimo direito, porém não diferenciado pela ultrassonografia dos tecidos adjacentes. Mas aos 120 dias, este mesmo nódulo palpável apresentou maior ecogenicidade podendo ser diferenciado dos tecidos adjacentes, com área de 35 mm², juntamente com outro nódulo anecóico com área de 78 mm². Aos 150 dias, o nódulo hiperecóico apresentou área de 136 mm² e o nódulo anecóico, 105 mm² e aos 180 dias pós-infecção, o nódulo anecóico apresentou área de 234 mm² e o hiperecóico 128 mm² (Figura 6-B). No exame pós-morte, este nódulo anecóico apresentou conteúdo com aspecto cremoso e amarelado (Figura 6-CD).

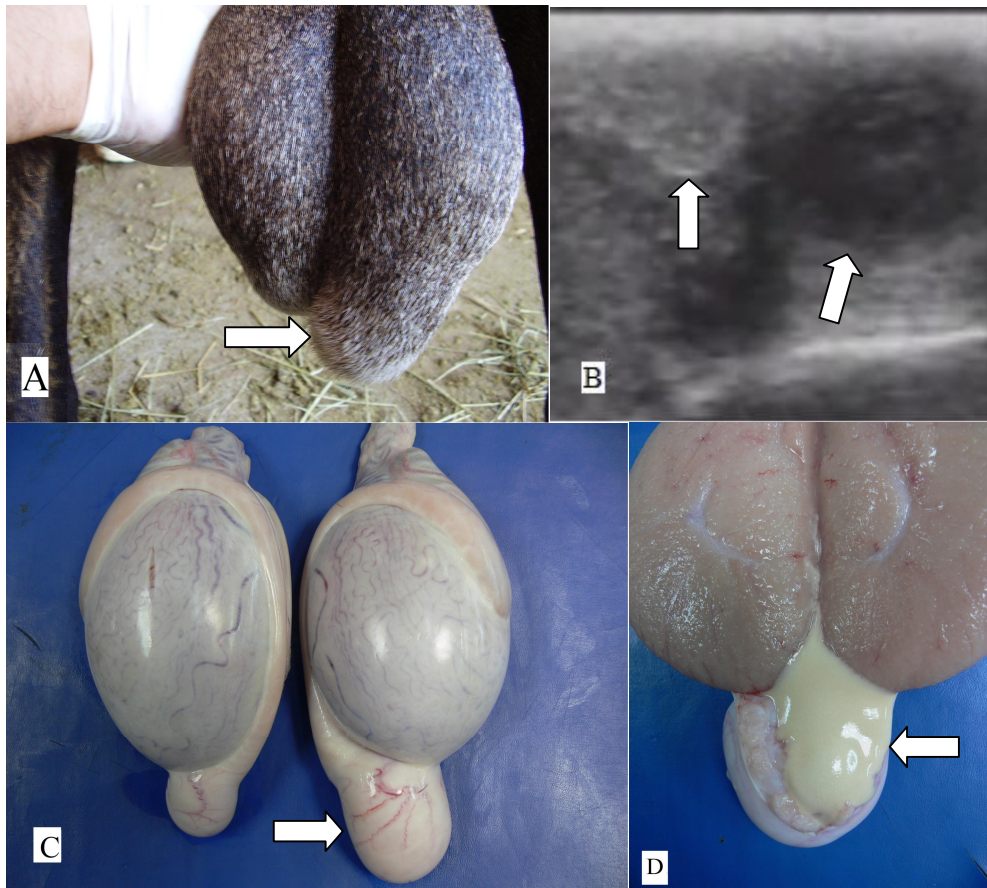


Figura 6 Características clínicas, ultrassonográficas e macroscópicas do granuloma espermático da cauda do epidídimo de um carneiro experimentalmente infectado com *Brucella ovis* aos 180 dias pós-infecção (Carneiro 3). Figura A ó Aumento da cauda do epidídimo; B ó Imagem ultrassonográfica de um nódulo hiperecótico e nódulo anecótico na cauda do epidídimo aumentada, Ultrasson Chison Vet 500, sonda linear de 5 MHz ; C - Cauda do epidídimo na necropsia; D ó Aspecto cremoso e amarelado do conteúdo do nódulo anecótico visto na ultrassonografia à necropsia.

As vesículas seminais não apresentaram alterações no parênquima com base na avaliação ultrassonográfica, porém observou-se aumento no comprimento e na

profundidade a partir dos 90 dias pós-infecção, mantendo estes valores até o fim do período experimental (Figura 7).

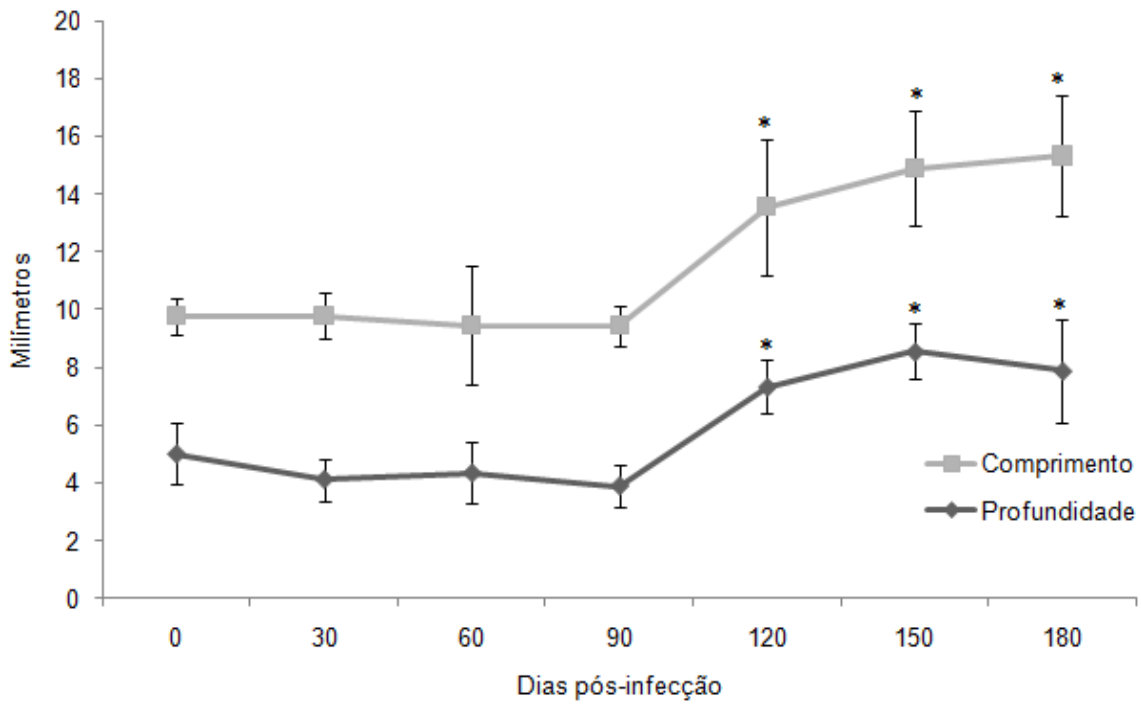


Figura 7. Profundidade e comprimento das vesículas seminais de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. As linhas representam média e as barras desvio padrão de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo pré-infecção, (* $p < 0,001$).

Tabela 3. Largura e comprimento das caudas dos epidídimos e dos testículos de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis*.

Dias de infecção	Medidas em cm pelo paquímetro							
	Largura TD	Largura TE	Comprimento TD	Comprimento TE	Largura CED	Largura CEE	Comprimento.CED	Comprimento CEE
Pré-infecção	5,53 ± 0,60 ^a	5,80 ± 0,50 ^a	9,41 ± 0,62 ^a	8,90 ± 0,43 ^{ab}	2,48 ± 0,23 ^a	2,34 ± 0,26 ^a	2,81 ± 0,34 ^a	2,60 ± 0,33 ^a
30 dias pós-infecção	5,39 ± 0,52 ^a	4,81 ± 0,82 ^{b**}	8,20 ± 0,77 ^a	8,10 ± 0,57 ^{ab}	2,68 ± 0,33 ^a	2,36 ± 0,37 ^a	2,97 ± 0,44 ^a	2,69 ± 0,32 ^a
60 dias pós-infecção	4,69 ± 0,61 ^a	5,32 ± 0,35 ^{ab}	8,34 ± 0,98 ^a	8,13 ± 1,01 ^{ab}	2,71 ± 0,53 ^a	2,60 ± 0,25 ^a	2,92 ± 0,41 ^a	2,71 ± 0,32 ^a
90 dias pós-infecção	5,36 ± 0,62 ^a	5,49 ± 0,58 ^{ab}	8,56 ± 0,69 ^a	7,94 ± 1,08 ^{b*}	2,69 ± 0,28 ^a	2,34 ± 0,22 ^a	3,32 ± 0,64 ^{ab}	2,97 ± 0,45 ^{ab}
120 dias pós-infecção	5,07 ± 0,55 ^a	5,30 ± 0,63 ^{ab}	8,70 ± 0,87 ^a	8,36 ± 0,65 ^{ab}	2,59 ± 0,44 ^a	2,33 ± 0,34 ^a	3,40 ± 0,28 ^{ab}	3,24 ± 0,25 ^{bc**}
150 dias pós-infecção	5,33 ± 0,75 ^a	5,33 ± 0,54 ^{ab}	9,31 ± 1,07 ^a	9,08 ± 0,80 ^a	2,63 ± 0,51 ^a	2,69 ± 0,33 ^a	3,70 ± 0,41 ^{b**}	3,56 ± 0,36 ^{c***}
180 dias pós-infecção	5,40 ± 0,60 ^a	5,40 ± 0,48 ^{ab}	9,28 ± 0,94 ^a	9,10 ± 0,83 ^a	2,82 ± 0,43 ^a	2,70 ± 0,38 ^a	3,70 ± 0,57 ^{b**}	3,44 ± 0,51 ^{c***}

Testículo direito (TD), Testículo esquerdo (TE), Cauda do epidídimo direito (CED), Cauda do epidídimo esquerdo (CEE). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de SNK. Níveis de significância são indicados por asteriscos. (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001).

Tabela 4. Alterações de sensibilidade, consistência e ecogenicidade encontradas nas caudas dos epidídimos de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis*.

Carneiro	Pré-infecção	30 dias pós-infecção		60 dias pós-infecção		90 dias pós-infecção		120 dias pós-infecção		150 dias pós-infecção		180 dias pós-infecção	
		Clínica	Ultrassom	Clínica	Ultrassom	Clínica	Ultrassom	Clínica	Ultrassom	Clínica	Ultrassom	Clínica	Ultrassom
1	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
2	NDN	NDN	NDN	NDN	CED, área anecóica 2 mm ²	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
3	NDN	CED aumento de consistência e sensibilidade	CED, nódulo anecóico 112 mm ²	NDN	CED, nódulo anecóico 78 mm ²	nódulo palpável	CED, nódulo anecóico 25 mm ²	nódulo palpável	CED, nódulo 78 mm ² e nódulo hiperecótico de 35 mm ²	CED, nódulo palpável	CED, nódulo anecóico 105 mm ² e nódulo hiperecótico de 136 mm ²	CED, nódulo palpável	CED, nódulo anecóico 234mm ² e nódulo hiperecótico de 128 mm ²
5	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
6	NDN	CEE aumento de consistência e sensibilidade CED e CEE, aumento de consistência e sensibilidade.	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
7	NDN	CED aumento de consistência e sensibilidade.	NDN	CED, aumento de consistência e sensibilidade	CED e CEE, área anecóica de 3 mm ² .	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
8	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
9	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
10	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN

Cauda do epidídimo direito (CED), Cauda do epidídimo esquerdo (CEE), Nada digno de nota (NDN).

Ao examinar o sêmen, o volume (Figura 8) e o turbilhonamento do ejaculado (Figura 9) não sofreram alterações, durante o período experimental. A motilidade total (Figura 10) e o vigor dos espermatozoides (Figura 11) apresentaram redução apenas aos 150 dias após a infecção, porém aos 180 dias retornaram aos parâmetros semelhantes ao

do período pré-infecção. A concentração espermática (Figura 12) e o total de espermatozoides móveis no ejaculado (Figura 13) sofreram redução logo nos primeiros 30 dias após a infecção e se mantiveram estatisticamente inferiores em relação ao período pré-infecção durante todo período experimental.

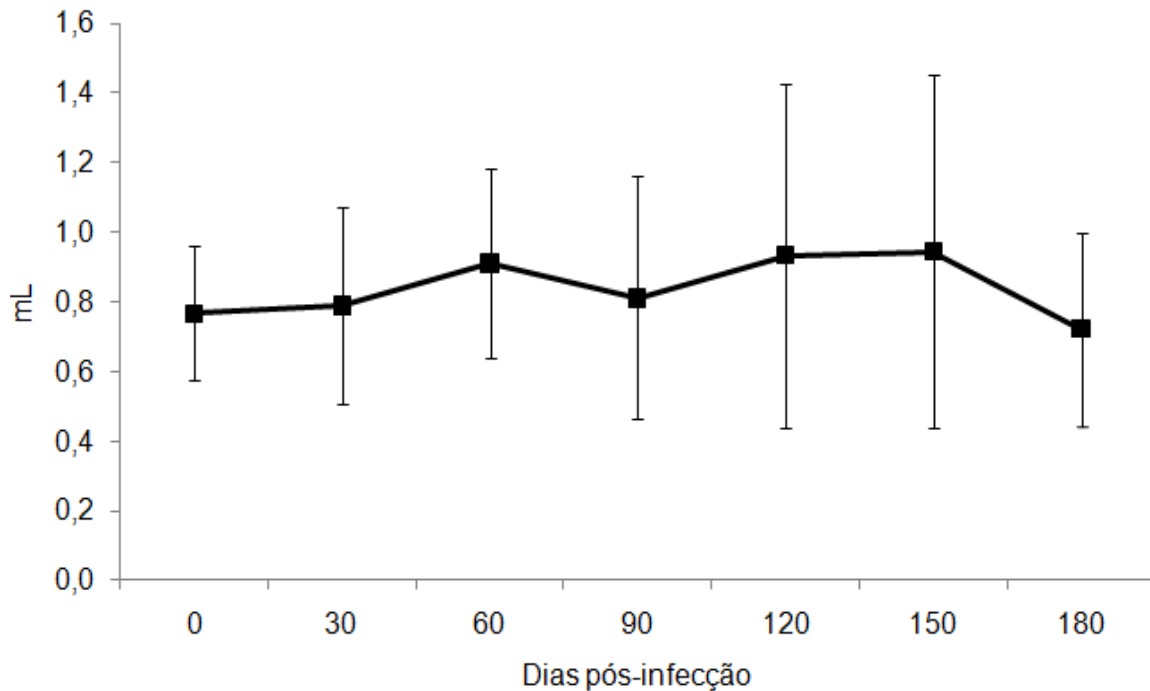


Figura 8. Volume do ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa média e as barras verticais o desvio padrão de nove carneiros.

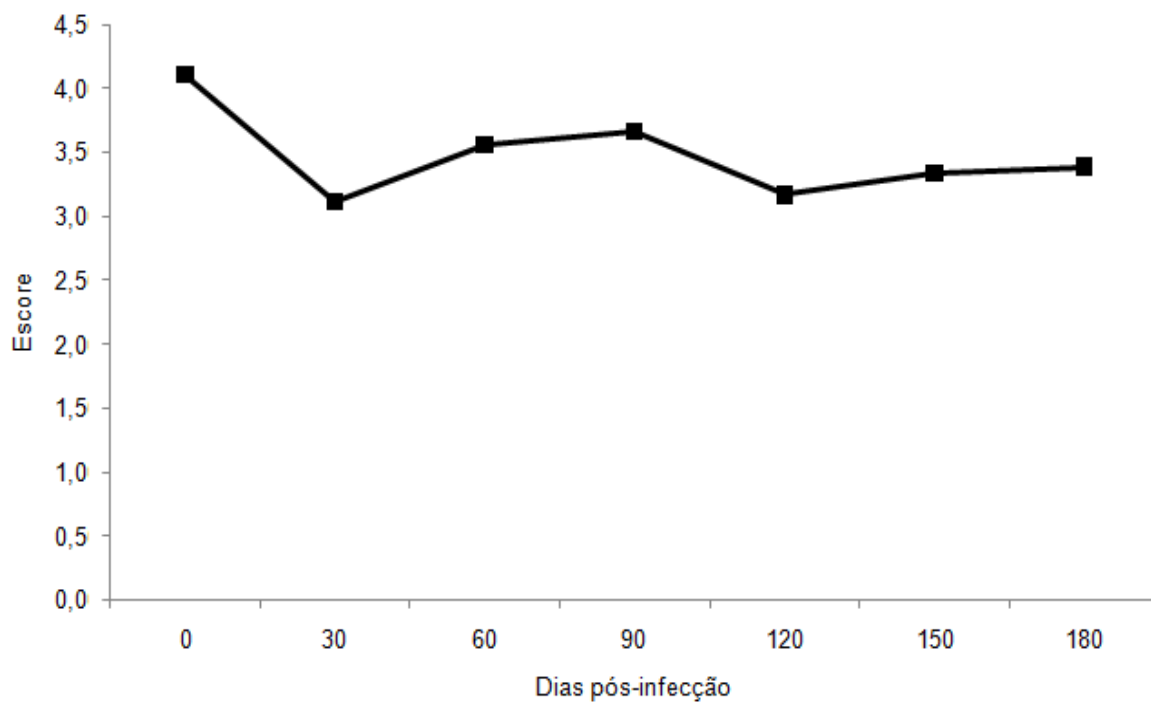


Figura 9. Turbilhonamento do ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média de nove carneiros.

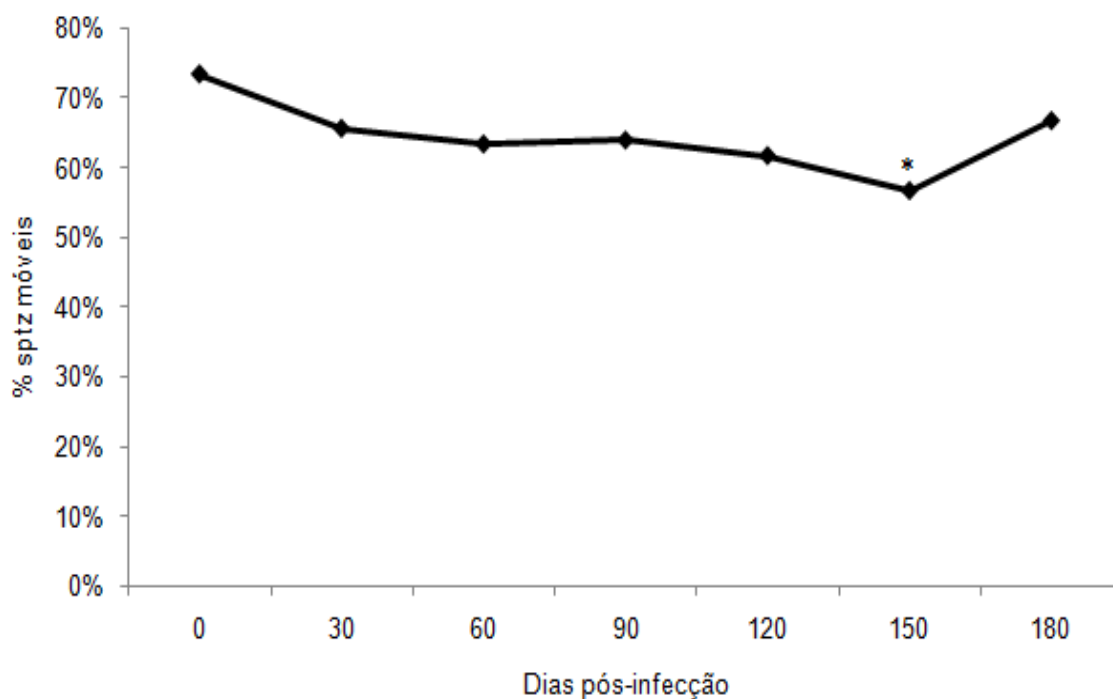


Figura 10. Porcentagem de espermatozoides móveis no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $p < 0,05$).

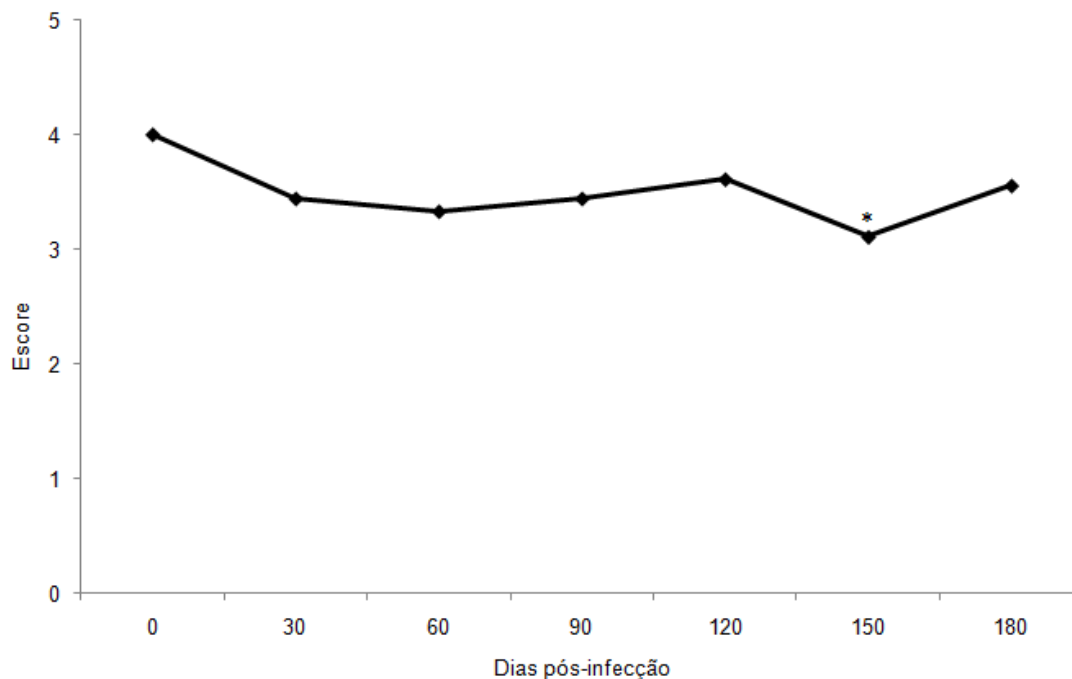


Figura 11. Vigor dos espermatozóides do ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa média de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $p < 0,05$).

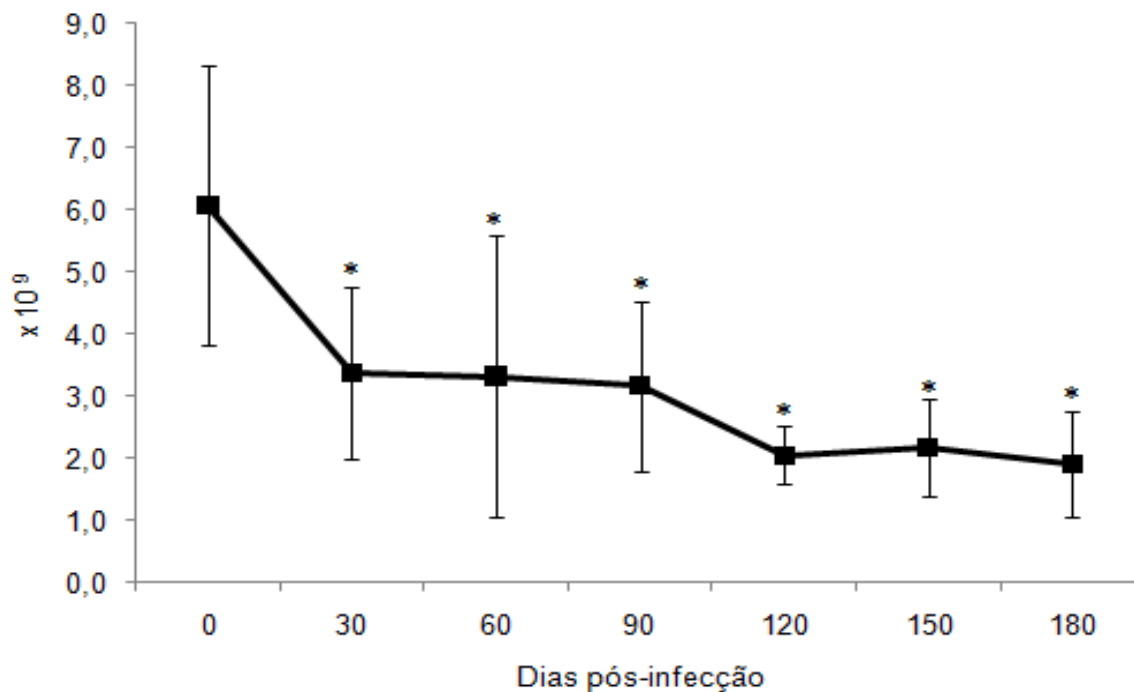


Figura 12. Concentração de espermatozóides no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa média e as barras verticais desvio padrão de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* $p < 0,05$).

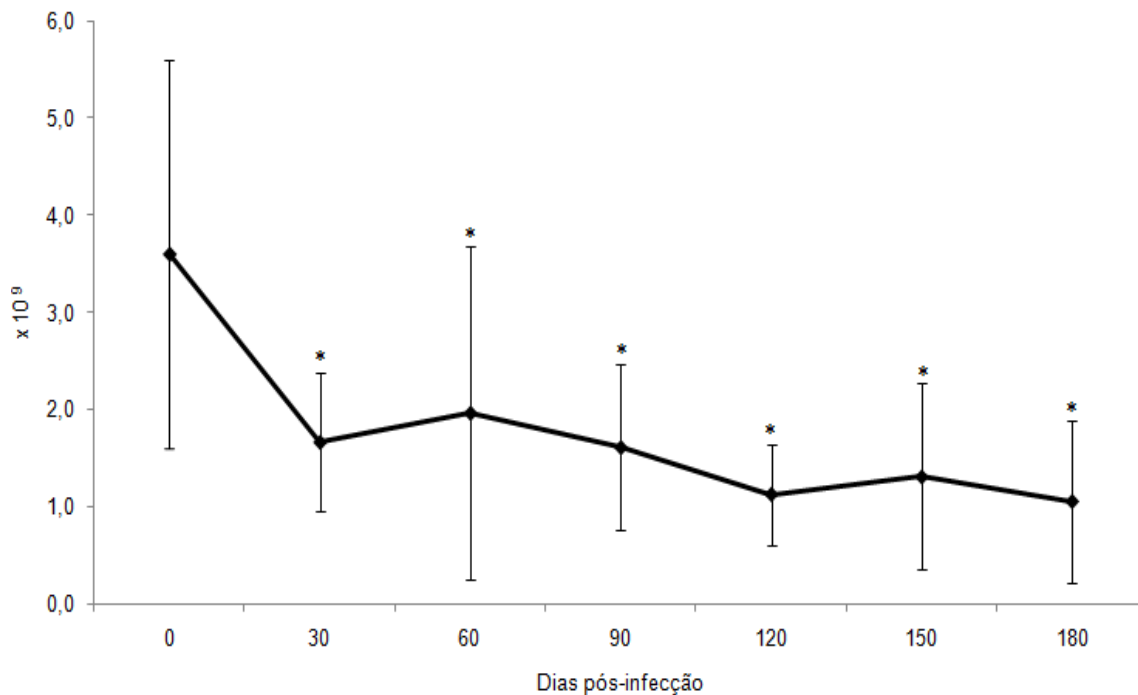


Figura 13. Total de espermatozoides móveis no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média e as barras verticais o desvio padrão de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em comparação ao tempo de pré-infecção (* p<0,05).

A morfologia espermática apresentou alterações logo nos primeiros 30 dias pós-infecção (Tabela 5), sendo que houve um aumento significativo na porcentagem de espermatozoides com cauda dobrada com gota, porém, aos 60 dias pós-infecção, os valores diminuíram tornando-se estatisticamente semelhantes ao período pré-infecção. Os percentuais de espermatozoides com cauda dobrada aumentaram após a

infecção, em todos os períodos exceto aos 60 dias. Os espermatozoides com cauda enrolada, defeito de peça intermediária, gota distal e gota proximal não apresentaram variações durante o período experimental. O total de espermatozoides com defeitos aumentou aos 30 dias pós-infecção, se mantendo até os 180 dias pós-infecção como demonstrado na Figura 14.

Tabela 5. Médias e desvios padrão para os tipos de defeitos encontrados nos espermatozóides de carneiros experimentalmente infectados por *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção.

Dias de infecção	Porcentagem dos Tipos de Defeito						
	Cabeça isolada	Cauda dobrada	Cauda dobrada com gota	Cauda enrolada	Defeito peça intermediária	Gota distal	Gota proximal
0	2,00 ± 0,00 ^a	3,67 ± 4,18 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	5,75 ± 3,69 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	6,67 ± 9,14 ^a	4,50 ± 3,54 ^a
30	1,00 ± 0,00 ^a	15,00 ± 9,73 ^{b***}	5,17 ± 4,54 ^{b*}	6,63 ± 7,33 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	4,38 ± 5,83 ^a	3,00 ± 0,00 ^a
60	2,13 ± 1,36 ^{b**}	8,50 ± 4,76 ^a	1,83 ± 1,17 ^{ab}	4,71 ± 4,54 ^a	5,50 ± 6,36 ^a	8,33 ± 9,24 ^{ac}	0,00 ± 0,00 ^a
90	2,50 ± 2,12 ^a	12,44 ± 5,15 ^{b***}	2,00 ± 0,00 ^a	2,67 ± 1,66 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^{ac}	0,00 ± 0,00 ^a
120	0,00 ± 0,00 ^a	17,22 ± 10,01 ^{b***}	1,33 ± 0,58 ^a	11,67 ± 12,50 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^{bc*}	1,00 ± 0,00 ^a
150	3,33 ± 2,73 ^{b*}	14,78 ± 7,60 ^{b***}	1,00 ± 0,00 ^a	6,67 ± 4,64 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	2,33 ± 1,53 ^{ac}	0,00 ± 0,00 ^a
180	2,00 ± 0,00 ^a	16,78 ± 5,09 ^{b***}	2,00 ± 0,00 ^a	4,00 ± 2,69 ^a	6,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^{bc*}	2,00 ± 1,00 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de SNK. Níveis de significância são indicados por asteriscos. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

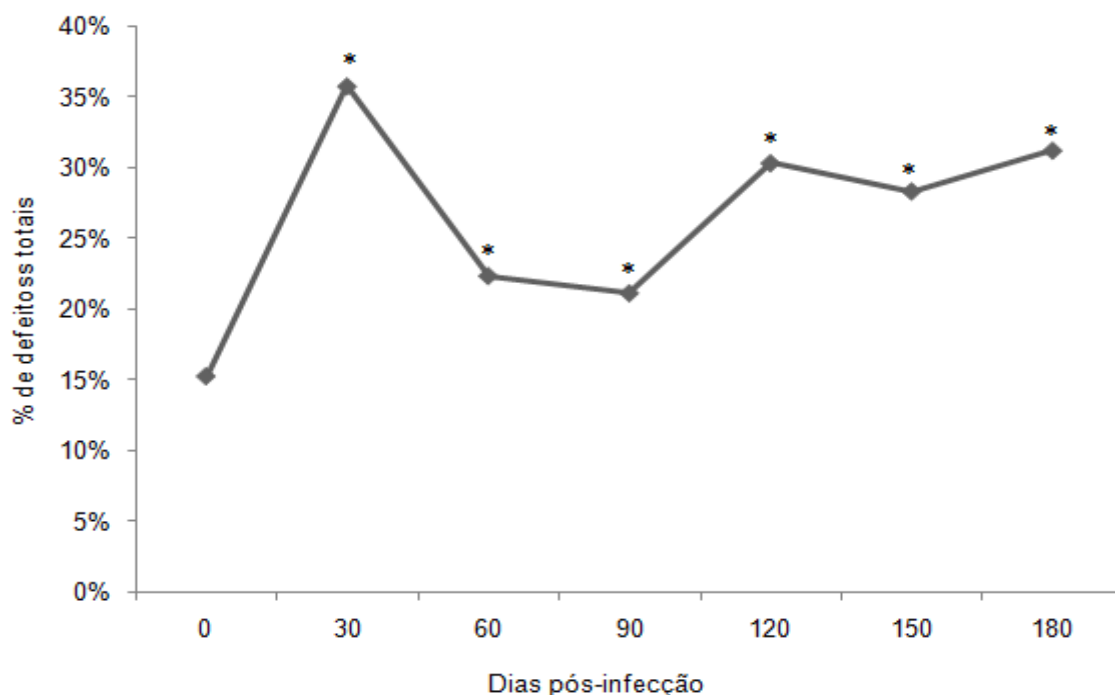


Figura 14. Porcentagem de defeitos totais encontrados no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção. A linha representa a média de nove carneiros. Asterisco indica diferença significativa em relação ao período de pré-infecção (* $p < 0,05$).

Foram feitos esfregaços dos ejaculados para pesquisa de células inflamatórias como sumarizado na Tabela 6. No período pré-infecção não foram encontradas células inflamatórias nos ejaculados, porém aos 30 dias pós-infecção, 44,44% (4/9) animais apresentaram células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e linfócitos no ejaculado, e aos 180 dias 100% (9/9) os animais apresentaram estes mesmos tipos celulares no ejaculado. A intensidade com

que este tipo celular foi encontrado nos esfregaços variou de discreto, moderado a intenso. A figura 15 representa um ejaculado com quantidade intensa de células inflamatórias. A frequência com que os animais eliminaram células inflamatórias também variou, sendo que dois dos nove animais apresentaram eliminação intermitente e o restante apresentou eliminação constante.

Tabela 6. Células inflamatórias no ejaculado de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* em diferentes tempos de infecção.

Animal	Dias pós-infecção						
	0	30	60	90	120	150	180
1	-	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	-	+	+
3	-	+++	++	+++	+++	+++	+++
4	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+
6	-	+	+	+	+	+	+
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+	+
9	-	++	++	++	+	+	++

Intensidade de células inflamatórias no ejaculado: discreto (+); moderado (++) e intenso (+++).

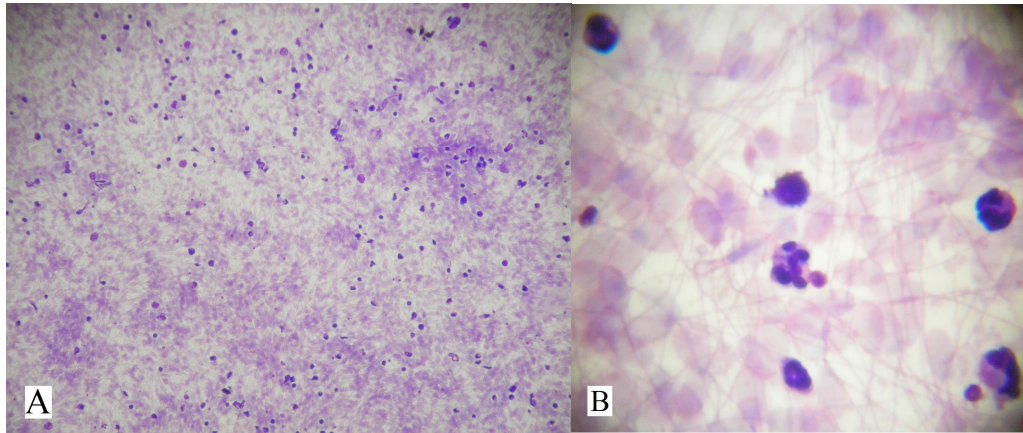


Figura 15. Intensa quantidade de células inflamatórias no ejaculado do carneiro número 3, com epididimite e vesiculite causadas pela infecção experimental com *Brucella ovis*. Figura A ó Células inflamatórias representadas pelos pontos basofílicos. Coloração por panótico rápido; 1,25X; B - Células inflamatórias com predomínio de neutrófilos. Coloração por panótico rápido; 100X.

Ao exame histopatológico, a glândula, prepúcio, bexiga, os rins, baço, fígado, linfonodos ilíacos e inguinais não apresentaram alterações associadas à infecção. No pulmão, um carneiro apresentou hemorragia intersticial multifocal discreta, que pode ter sido causada pelo método de sacrifício utilizado. No coração, cinco dos nove animais apresentaram cistos no interior das miofibras sem presença de inflamação, caracterizando *Sarcocystis* sp. Dois carneiros apresentaram infiltrado inflamatório linfo-histio-plasmocitário

intersticial, focal e discreto no funículo espermático e um carneiro apresentou este tipo de alteração inflamatória na ampola do ducto deferente. Todos os carneiros (9/9) apresentaram alterações inflamatórias nas vesículas seminais, que foi caracterizada por infiltração linfohistioplasmocitária intersticial, multifocal, variando de discretas (5/9), moderadas (2/9) e intensas (2/9), sendo quatro carneiros apresentaram neutrófilos na luz dos ácinos e em seis dos nove carneiros estas alterações foram bilaterais (Figura 16).

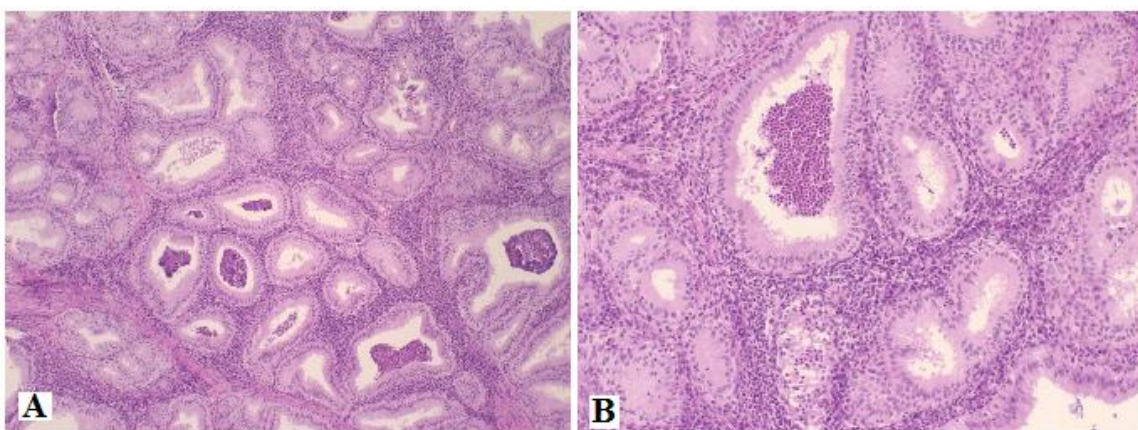


Figura 16. Vesiculite no carneiro número 3 causada pela infecção experimental com *Brucella ovis*. A - Áreas de hiper-celularidade (infiltrado inflamatório) multifocal no interstício e na luz luminal. H.E. 1,25X; B ó acúmulo intraluminal de neutrófilos e infiltrado inflamatório intersticial linfohistioplasmocitário H.E. 100X.

Nos epidídimos, foram observadas lesões na região da cabeça de todos os carneiros, sendo bilaterais em seis animais. Oito dos nove carneiros apresentaram lesões no corpo do epidídimo, sendo bilaterais em três. Estas lesões caracterizaram-se por infiltrado linfohistioplasmocitário intersticial, discreto e focal. Na cauda do epidídimo, todos os carneiros apresentaram infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário intersticial, sendo que em seis carneiros, as

lesões foram bilaterais. O infiltrado apresentou distribuição focal em seis, multifocal em dois e difuso em um animal. A intensidade da lesão foi discreta em dois animais, moderada em sete e intensa com formação de granuloma espermático, vacuolização do epitélio e formação de células gigantes em um dos carneiros (Figura 17).

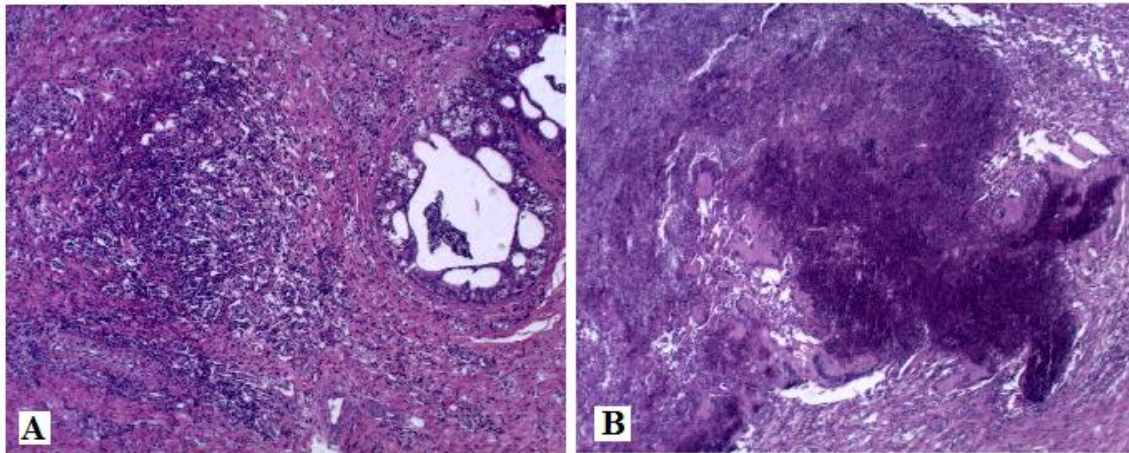


Figura 17. Epididimite na da cauda do epidídimo de um carneiro experimentalmente infectado com *Brucella ovis* (carneiro 3). A - áreas de hiper-celularidade no interstício e vacuolização do epitélio H.E. 1,25X, B ó formação de granuloma espermático com de células gigantes na periferia H.E. 100X.

Histologicamente, os testículos de todos os carneiros apresentaram descamação e vacuolização do epitélio do túbulo seminífero e dilatação do lúmen. As células da linhagem espermática apresentaram aumento da eosinofilia citoplasmática e condensação nuclear, além da ausência de células da linhagem espermática na luz do túbulo seminífero. Estes achados foram observados em cinco dos nove animais de forma bilateral e em quatro unilateralmente. A intensidade destas alterações variou de discreta (3/9) a moderada (6/9).

Na avaliação morfométrica, os carneiros infectados experimentalmente apresentaram maior proporção volumétrica de interstício e lúmen e menor proporção de epitélio quando comparados aos carneiros não infectados. Além disso, os animais infectados apresentaram maior diâmetro do túbulo seminífero em relação ao grupo referênci, contudo, a altura do epitélio não apresentou diferença bem como as demais estruturas estudadas como sumarizada na Tabela 7.

Tabela 7. Morfometria testicular e contagem diferencial das células do epitélio seminífero de carneiros experimentalmente infectados com *Brucella ovis* (Tratamento) e carneiros sadios (referência).

Morfometria	Grupos	
	Tratamento	Referência
Diâmetro do Túbulo (μm)	93,44 \pm 5,69 ^a	88,02 \pm 6,50 ^{b*}
Altura do epitélio (μm)	27,11 \pm 0,60 ^a	27,89 \pm 2,33 ^a
Número de espermátides arredondadas	123,29 \pm 17,62 ^a	117,18 \pm 16,13 ^a
Número de paquitone	41,08 \pm 12,65 ^a	40,13 \pm 14,75 ^a
Número de preleptotene	21,64 \pm 3,69 ^a	21,90 \pm 11,87 ^a
Número de espermatogônia A	1,96 \pm 0,33 ^a	1,76 \pm 0,38 ^a
Número de células de Sertoli	5,61 \pm 1,26 ^a	8,43 \pm 1,90 ^a
Total de células	193,57 \pm 31,56 ^a	189,39 \pm 39,69 ^a
Proporção Volumétrica		
Interstício (%)	21,42 \pm 2,71 ^a	17,74 \pm 2,60 ^{b*}
Lúmen (%)	18,26 \pm 2,12 ^a	14,09 \pm 1,93 ^{b**}
Epitélio (%)	60,33 \pm 1,73 ^a	68,18 \pm 3,87 ^{b***}

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de SNK. Níveis de significância são indicados por asteriscos (p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

As correlações entre as características clínicas, ultrassonográficas, e seminais dos animais experimentalmente infectados com *B. ovis* foram avaliadas como sumarizada na Tabela 8. As áreas dos testículos obtidas por ultrassonografia apresentaram correlação positiva e significativa com as mensurações de largura e comprimento testiculares obtidas através do paquímetro e com a circunferência escrotal. As áreas das caudas dos epidídimos obtidas por ultrassonografia apresentaram correlação positiva com as mensurações de largura e comprimento obtidas através do paquímetro, porém, uma correlação negativa com concentração espermática.

As medidas ultrassonográficas de comprimento e profundidade das vesículas seminais apresentaram correlação positiva com as áreas das caudas dos epidídimos, correlação negativa com concentração espermática e total de espermatozóides móveis no ejaculado e correlação positiva com defeitos totais.

A concentração espermática apresentou correlação positiva com total de espermatozóides móveis no ejaculado, motilidade total, e correlação negativa com

defeitos totais. Enquanto a motilidade total apresentou correlação positiva com o total de espermatozóides móveis no ejaculado e correlação negativa com defeitos totais.

A consistência testicular apresentou correlação positiva com vigor (r= 0,20; p<0,05) e negativa com células inflamatórias no ejaculado (r= -0,44; p<0,0002), e por fim, o vigor apresentou correlação positiva com turbilhão do ejaculado (r=0,52; p<0,0001).

Tabela 8. Correlação entre os parâmetros clínicos, ultrassonográficos e espermáticos de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis*.

	DEFT	MT	TEMEJ	CONC	VEJ	CE	CVS	PVS	PCCEE	PLCEE	PCCED	PLCED	ACEE	ACED	PCTE	PLTE	PCTD	PLTD	ATE	
MT	r= - 0,13 p< 0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEMEJ	r= -0,23 p< 0,03	r= 0,38 p< 0,0006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CONC	r= -0,25 p< 0,02	r= 0,21 p< 0,04	r= 0,84 p< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VEJ	r= 0,02 p< 0,40	r= 0,05 p< 0,32	r= 0,40 p< 0,0002	r= 0,03 p< 0,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CE	r= -0,8 p< 0,25	r= 0,18 p< 0,07	r= 0,09 p< 0,22	r= -0,01 p< 0,45	r= 0,13 p< 0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CVS	r= 0,27 p< 0,01	r= -0,15 p< 0,11	r= -0,27 p< 0,01	r= -0,39 p< 0,0005	r= 0,08 p< 0,27	r= 0,28 p< 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVS	r= 0,02 p< 0,17	r= -0,11 p< 0,21	r= -0,28 p< 0,01	r= -0,35 p< 0,002	r= 0,03 p< 0,41	r= 0,23 p< 0,03	r= 0,85 p< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCCEE	r= 0,17 p< 0,07	r= -0,21 p< 0,04	r= -0,17 p< 0,07	r= -0,39 p< 0,0004	r= 0,34 p< 0,002	r= 0,38 p< 0,001	r= 0,62 p< 0,0001	r= 0,51 p< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLCEE	r= -0,02 p< 0,41	r= -0,03 p< 0,39	r= -0,13 p< 0,13	r= -0,26 p< 0,01	r= 0,12 p< 0,15	r= 0,42 p< 0,0001	r= 0,23 p< 0,03	r= 0,37 p< 0,03	r= 0,37 p< 0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCCED	r= 0,16 p< 0,10	r= 0,02 p< 0,43	r= -0,18 p< 0,07	r= -0,39 p< 0,0004	r= 0,26 p< 0,01	r= 0,36 p< 0,001	r= 0,55 p< 0,0001	r= 0,40 p< 0,0003	r= 0,64 p< 0,0001	r= 0,37 p< 0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLCED	r= 0,16 p< 0,09	r= 0,12 p< 0,15	r= 0,03 p< 0,38	r= -0,11 p< 0,2	r= 0,24 p< 0,02	r= 0,36 p< 0,001	r= 0,16 p< 0,1	r= -0,006 p< 0,48	r= 0,26 p< 0,01	r= 0,47 p< 0,0001	r= 0,44 p< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACEE	r= 0,03 p< 0,40	r= 0,02 p< 0,44	r= -0,03 p< 0,41	r= -0,6 p< 0,31	r= -0,01 p< 0,44	r= 0,55 p< 0,0001	r= 0,51 p< 0,0001	r= 0,50 p< 0,0001	r= 0,37 p< 0,001	r= 0,30 p< 0,005	r= 0,40 p< 0,0002	r= 0,22 p< 0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
ACED	r= 0,02 p< 0,42	r= 0,07 p< 0,26	r= -0,07 p< 0,29	r= -0,22 p< 0,03	r= 0,16 p< 0,09	r= 0,73 p< 0,0001	r= 0,59 p< 0,0001	r= 0,49 p< 0,0001	r= 0,50 p< 0,0001	r= 0,49 p< 0,0001	r= 0,64 p< 0,0001	r= 0,38 p< 0,001	r= 0,76 p< 0,0001	-	-	-	-	-	-	-
PCTE	r= 0,10 p< 0,21	r= 0,24 p< 0,02	r= 0,10 p< 0,19	r= -0,10 p< 0,19	r= 0,21 p< 0,03	r= 0,61 p< 0,0001	r= 0,34 p< 0,002	r= 0,30 p< 0,01	r= 0,42 p< 0,001	r= 0,42 p< 0,0001	r= 0,34 p< 0,002	r= 0,34 p< 0,002	r= 0,57 p< 0,0001	r= 0,55 p< 0,0001	-	-	-	-	-	-
PLTE	r= 0,02 p< 0,41	r= 0,26 p< 0,01	r= 0,15 p< 0,11	r= 0,13 p< 0,14	r= 0,02 p< 0,41	r= 0,61 p< 0,0001	r= 0,10 p< 0,20	r= 0,10 p< 0,2	r= 0,42 p< 0,0001	r= 0,34 p< 0,002	r= 0,34 p< 0,002	r= 0,34 p< 0,002	r= 0,50 p< 0,0001	r= 0,38 p< 0,0001	r= 0,50 p< 0,0001	r= 0,50 p< 0,0001	r= 0,81 p< 0,0001	r= 0,63 p< 0,0001	-	-
PCTD	r= 0,02 p< 0,43	r= 0,23 p< 0,03	r= 0,12 p< 0,17	r= -0,39 p< 0,0004	r= 0,26 p< 0,01	r= 0,67 p< 0,001	r= 0,35 p< 0,001	r= 0,37 p< 0,001	r= 0,81 p< 0,0001	r= 0,63 p< 0,0001	r= 0,35 p< 0,001	r= 0,28 p< 0,01	r= 0,60 p< 0,0001	r= 0,56 p< 0,0001	r= 0,81 p< 0,0001	r= 0,63 p< 0,0001	r= 0,55 p< 0,0001	r= 0,76 p< 0,0001	r= 0,55 p< 0,0001	-
PLTD	r= 0,11 p< 0,17	r= 0,07 p< 0,29	r= 0,03 p< 0,40	r= 0,06 p< 0,30	r= -0,03 p< 0,39	r= 0,52 p< 0,0001	r= 0,08 p< 0,25	r= 0,06 p< 0,3	r= 0,16 p< 0,1	r= 0,29 p< 0,01	r= 0,19 p< 0,06	r= 0,23 p< 0,03	r= 0,50 p< 0,0001	r= 0,41 p< 0,0002	r= 0,39 p< 0,001	r= 0,76 p< 0,0001	r= 0,76 p< 0,0001	r= 0,55 p< 0,0001	r= 0,60 p< 0,0001	r= 0,57 p< 0,0001
ATE	r= 0,03 p< 0,39	r= 0,23 p< 0,03	r= 0,07 p< 0,27	r= 0,02 p< 0,44	r= -0,3 p< 0,40	r= 0,73 p< 0,0001	r= 0,32 p< 0,004	r= 0,37 p< 0,001	r= 0,21 p< 0,04	r= 0,35 p< 0,001	r= 0,27 p< 0,01	r= 0,22 p< 0,03	r= 0,74 p< 0,0001	r= 0,61 p< 0,0001	r= 0,61 p< 0,0001	r= 0,60 p< 0,0001	r= 0,60 p< 0,0001	r= 0,60 p< 0,0001	r= 0,60 p< 0,0001	r= 0,57 p< 0,0001
ATD	r= -0,02 p< 0,44	r= 0,13 p< 0,14	r= 0,01 p< 0,46	r= -0,71 p< 0,24	r= 0,06 p< 0,32	r= 0,73 p< 0,0001	r= 0,47 p< 0,0001	r= 0,48 p< 0,0001	r= 0,37 p< 0,001	r= 0,41 p< 0,0002	r= 0,47 p< 0,0001	r= 0,28 p< 0,01	r= 0,76 p< 0,0001	r= 0,70 p< 0,0001	r= 0,65 p< 0,0001	r= 0,48 p< 0,0001	r= 0,70 p< 0,0001	r= 0,48 p< 0,0001	r= 0,48 p< 0,0001	r= 0,85 p< 0,0001

ATD= Área do testículo direito; ATE= Área do testículo esquerdo; PLTD= Largura do testículo direito dados de paquímetro; PCTD= Comprimento do testículo direito dados de paquímetro; PLTE= Largura do testículo esquerdo dados de paquímetro; PCTE= Comprimento do testículo esquerdo dados de paquímetro; ACED= área da cauda do epidídimo direito; ACEE= Área da cauda do epidídimo esquerdo; PLCEE= Largura da cauda do epidídimo direito dados de paquímetro; PLCED= Largura da cauda do epidídimo esquerdo dados de paquímetro; PCCED= Comprimento da cauda do epidídimo direito dados de paquímetro; PLCEE= Largura da cauda do epidídimo esquerdo dados de paquímetro ; PCCEE= Comprimento da cauda do epidídimo esquerdo dados de paquímetro; PVS= Profundidade da vesícula seminal; CVS= Comprimento da vesícula seminal; CE= Circunferência escrotal; TEMEJ= Total de espermatozoides móveis no ejaculado; MT= Motilidade total; DEFT= Defeitos totais; CONC= Concentração espermática.

5. DISCUSSÃO

Os carneiros experimentalmente infectados com *B. ovis* apresentaram alterações clínicas, ultrassonográficas e histológicas apenas nos órgãos do aparelho reprodutivo. A intensidade das lesões foram maiores na cauda dos epidídimos e nas vesículas seminais, sendo que na cauda do epidídimo somente um animal apresentou lesões intensas na histopatologia. Já na vesícula seminal, dois carneiros apresentaram lesões intensas e os demais apresentaram lesões multifocais associadas à infecção previamente confirmada por Xavier e colaboradores (2009) através de bacteriologia e PCR. Além dos epidídimos, as vesículas seminais são importantes sítios de ação da bactéria.

Estes achados estão de acordo com Bruckrell e colaboradores (1985), nas quais as alterações histopatológicas da infecção por *B. ovis* se caracterizam por infiltrado inflamatório contendo linfócitos e neutrófilos no interstício, lúmen e epitélio da cauda, corpo e cabeça dos epidídimos. De acordo com Jansen (1980), a incidência de lesões histopatológicas características da infecção em animais naturalmente infectados foi de 60% nas vesículas seminais e de 42% nos epidídimos, corroborando com os achados no presente trabalho.

Dos carneiros infectados, 66,7% apresentaram alterações clínicas aos 30 dias pós-inoculação, sendo que destas alterações, 83,3% foram unilaterais. Além disso, dos 6 carneiros com alterações clínicas na cauda dos epidídimos, 50% sofreram reversão do quadro. Lesões palpáveis na cauda dos epidídimos foram observadas em apenas 33% dos animais, estes achados estão de acordo com a revisão de Santos e colaboradores (2005), qual descreve que somente 36,4% dos animais com bacteriologia positiva para *B. ovis* apresentam lesões palpáveis nos epidídimos. Segundo estudo feito por Robles (1998) dos 75 animais afetados, 66% apresentou lesões unilaterais e somente 34% lesões bilaterais. Bagley e colaboradores (1985) encontraram resultado semelhante, nos quais apenas 23% dos animais examinados tinham lesões palpáveis, destas 17,3% eram unilaterais e

5,6% bilaterais. A infecção por *B. ovis* é caracterizada pela formação de granulomas espermáticos (Cerri et al., 2002; Arsenault et al., 2004; Kennedy et al., 1956), resultando em degeneração testicular e queda na qualidade do sêmen com conseqüente baixa de fertilidade (Simmons & Hall, 1953; Kennedy et al., 1956; Magalhães Neto & Turnes 1996). Segundo Bagley (1984) existe uma correlação positiva entre o grau das lesões nos epidídimos e a diminuição na qualidade do sêmen. Adicionalmente, carneiros portadores de alterações clínicas causadas pela *B. ovis* podem retornar a condição normal após algumas semanas pós-infecção (Santos et al., 2005).

Alterações ultrassonográficas foram visualizadas na cauda dos epidídimos de três carneiros após a infecção e o aumento de volume do órgão pode ser acompanhado com precisão por esta técnica. As lesões causadas pela infecção experimental por *B. ovis* são semelhantes às descritas por Ahmad e colaboradores (1991). Bodes e carneiros com lesões testiculares e epididimárias induzidas quimicamente, apresentaram a cauda do epidídimo aumentada de volume e áreas anecóicas com bordas hiperecóicas bem definidas ao ultrassom, diagnosticada através da histologia como granuloma espermático (Ahmad et al., 1991) Os achados ultrassonográficos encontradas no presente estudo também condizem com as características ultrassonográficas encontradas em animais portadores de granulomas espermáticos na cauda do epidídimo (Karaca et al. 1999) e em carneiros unilateralmente vasectomizados devido à interrupção do fluxo do sêmen (Gouletsou et al., 2008)

O aumento de tamanho das vesículas seminais também pode ser acompanhado por ultrassom, embora alterações no parênquima deste órgão não tenham sido visualizadas. Segundo Hull & Vogel (2008) a palpação de abscessos em touros com vesiculite seminal é um achado menos frequente em comparação com as alterações de volume do órgão. A ultrassonografia trans-retal tem sido utilizada em estudos que visam mensurar com precisão as dimensões da vesícula seminal e sua relação anatômica (Griffin & Guinther, 1992). Chandolia e colaboradores.

(1997) estudando a associação entre as alterações endócrinas e o desenvolvimento das glândulas acessórias, puderam acompanhar através da ultrassonografia trans-retal a dinâmica do desenvolvimento da vesícula seminal durante o aumento da concentração de andrógenos em touros.

No presente estudo, o aumento de do tamanho da vesícula seminal estava associado ao processo inflamatório decorrente da infecção experimental com *B. ovis*. A infecção das vesículas seminais pode ter ocorrido por via descendente ou hematogênica (Hull & Vogel, 2008). Estes achados condizem com os achados de vesiculite seminal em bisões infectados pela *B. abortus* onde foi encontrado infiltrado inflamatório intersticial variando de leve a moderado em quatro de cinco animais examinados por Rhyan e colaboradores em 1997. E também condizentes com achados relatados em touros, nos quais a vesiculite seminal esta aumentada de volume e com menor distinção da lobulação à palpação (Hull & Vogel, 2008).

Dos nove carneiros utilizados no presente trabalho, somente um desenvolveu granuloma espermático na cauda do epidídimo. O restante dos animais desenvolveram epididimite sub-clínica, ou tiveram regressão do quadro clínico. A vesiculite seminal esteve presente nos nove animais utilizados no estudo.

Dentre os carneiros com alterações clínicas ou sub-clínicas causadas pela *B. ovis*, todos apresentaram células inflamatórias no ejaculado após a infecção, com frequência e intensidades distintas entre os animais. Aos 30 dias pós-infecção, apenas 44% dos animais apresentaram células inflamatórias no ejaculado enquanto que, aos 180 dias, 100% dos animais. Ao longo da infecção. A presença de células inflamatórias no ejaculado tem sido associada a lesões no trato genital como epididimite e a vesiculite (Bagley et al., 1984; Jansen, 1980) e pode ser considerada uma ferramenta útil para indicação da ocorrência de processo infeccioso pela análise do sêmen.

As alterações morfométricas encontradas no epitélio seminífero são condizentes com os dados de Gouletsou (2004), onde numerosos vacúolos foram vistos no parênquima testicular acompanhados de desestruturação do epitélio germinativo. Animais acometidos por insultos testiculares apresentam diminuição no número de espermatídes ou mesmo ausência de várias camadas de células do epitélio seminífero (Sartori et al., 2002; Costa et al., 2007).

O estudo da proporção volumétrica dos animais infectados apresentou características compatíveis com degeneração testicular quando comparados ao grupo referência, como diminuição do epitélio, aumento do lúmen do túbulo seminífero e do interstício conforme achados de Lunastra & Schanbacher (1998), contudo, é importante salientar que os animais com degeneração testicular podem apresentar vários graus de degeneração do epitélio seminífero na histologia dependendo da causa, intensidade e duração da agressão (Watt, 1978).

A diminuição do número de espermatídes e ausência das camadas de células do epitélio seminífero foram encontradas na histologia de forma leve a moderada nos carneiros infectados com *B. ovis* e estes achados indicam degeneração testicular. Contudo, na morfometria, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparados com o grupo de animais referência, ou seja, não infectados.

Os sinais clínicos de degeneração testicular foram mais acentuados nas primeiras semanas após a inoculação quando comparadas ao momento da eutanásia aos 192 dias pós-infecção. Segundo Gouletso e colaboradores (2004), carneiros aos 71 dias de inoculação com *Arcanobacterium pyogenes* apresentaram menor grau de degeneração dos testículos que os animais com 9 e 17 dias, e ainda, aos 113 dias pós inoculação já observaram regeneração dos túbulos seminíferos e a espermiogênese mais evidente.

A área dos testículos mensurada por ultrassonografia apresentou redução após a infecção retornando ao normal 120 dias pós-

infecção, seguindo o mesmo padrão da circunferência escrotal. A *B. ovis* causa inflamação nos epidídimos e isto leva a um aumento de temperatura local. A íntima ligação entre o testículo e o epidídimo inflamado leva a uma falha na termorregulação. Animais com a capacidade de termorregulação testicular alterada sofrem redução na circunferência escrotal e consistência testicular devido a processos degenerativos (Moreira et al., 2001). Esta condição pode ser reversível dependendo da duração e intensidade da causa desencadeadora do processo (Valle Filho, 2007).

Baseado na literatura consultada, este estudo parece ser o primeiro trabalho no qual foi avaliado a dinâmica da área testicular em animais infectados com *B. ovis* através da ultrassonografia. Em um estudo feito por Gouletsou e colaboradores demonstrou que testículos inoculados com *Arcanobacterium pyogenes* apresentaram menor tamanho que os testículos dos animais controle, quando mensurados através da ultrassonografia, mostrando a utilidade da técnica no estudo das patologias do sistema reprodutivo dos machos. As dimensões e as características da morfologia ultrassonográfica são ferramentas que permitem o estudo dos processos patológicos dos testículos (Griffin & Ginther, 1992; Eilts et al., 1993; Chandolia et al., 1997; Ülker et al., 2005).

As áreas dos testículos mensuradas através da ultrassonografia apresentaram correlação positiva com as mensurações de circunferência escrotal, largura e comprimento testicular realizados através do paquímetro. Resultados semelhantes foram obtidos por Cartee e colaboradores (1990), que encontraram correlações positivas entre o volume testicular mensurado através da ultrassonografia com circunferência escrotal, diâmetro, circunferência e peso testicular em carneiros sadios. Estes resultados demonstram que as técnicas empregadas neste estudo são válidas para acompanhar a dinâmica de crescimento dos testículos em situação fisiológica ou patológica, porém a ultrassonografia tem a vantagem de possibilitar de uma forma não invasiva o exame do parênquima dos testículos, epidídimos e vesícula seminal.

As mensurações ultrassonográficas do aumento das vesículas seminais e das áreas da cauda dos epidídimos devido ao processo inflamatório causado pela infecção experimental por *B. ovis* apresentaram correlações positivas com o aumento do número de espermatozóides com defeitos, diminuição da concentração espermática e diminuição do número de espermatozóides móveis, mostrando que o comprometimento destes órgãos pela infecção acarreta queda na qualidade do ejaculado dos carneiros e que quanto mais severo for o comprometimento destes órgãos maiores serão os impactos negativos sobre a fertilidade.

A ecogenicidade do parênquima testicular, a visualização e as características de ecogenicidade do mediastino, observadas neste estudo, estão de acordo com os achados em carneiros e bodes sadios de Ahmad e colaboradores (1991) e Gouletsou e colaboradores (2003). Segundo Karaca e colaboradores (1999), granulomas espermáticos presentes no parênquima testicular, na maioria das vezes, são microscópicos e não são visualizados pela ultrassonografia. Porém, pontos hiperecóticos no parênquima testicular foram observados e caracterizado pela falta de sombra acústica no exame ultrassonográfico como pontos de fibrose testicular. Em bovinos, Barth e colaboradores (2008) descrevem estas estruturas como sendo lesões fibrosas de causa desconhecida, que se desenvolvem durante o final do período puberal, porém, não influenciam na porcentagem de espermatozóides com defeitos.

Os animais experimentalmente infectados com *B. ovis* apresentaram menor qualidade do ejaculado e menor concentração espermática após a infecção, condizendo com os achados em animais naturalmente infectados (Bagley et al., 1984; Buckrell et al., 1985). Segundo Swift & Weyerts (1969), ao estudar animais naturalmente infectados, identificaram a redução na concentração e motilidade espermática em animais com epididimite clínica. Neste presente estudo, seis de nove animais apresentaram alterações clínicas após a inoculação, mas somente três dos animais não sofreram regressão do quadro apresentado. Não foram encontradas

diferenças estatísticas para motilidade entre período pré e pós-infecção, o que pode ter sido influenciado pela intensidade e duração das lesões no epidídimo. Entretanto, após a inoculação a concentração espermática e o total de espermatozóides móveis no ejaculado diminuíram e o número de espermatozóides com defeitos aumentou, indicando que animais infectados assintomáticos podem ser subférteis (Santos et al., 2005).

Após a infecção, os carneiros apresentaram um aumento no número de espermatozóides com cauda dobrada, cauda dobrada com gota e cabeça isolada no ejaculado. Uma porcentagem maior de defeitos no ejaculado de animais naturalmente infectados por *B. ovis* foi descrita por Magalhães Neto & Turnes (1996), sendo os defeitos de cauda e cabeça isolada os mais frequentes. Segundo Valle Filho (2007), a presença de espermatozóides com caudas dobradas ou enroladas, gota citoplasmática distal, defeitos de peça intermediária e cabeça isolada em elevada proporção estão relacionados a processos patológicos na cauda do epidídimo. O desenvolvimento da epididimite expõe o espermatozóide a secreções epididimárias com a pressão osmótica alterada, o que propicia o surgimento de defeitos de cauda (Barth & Oko, 1989). Estas alterações podem estar associadas a anormalidades oriundas de degeneração das células da camada basal da cauda do epidídimo (Cupps & Briggs, 1965).

Adicionalmente, a presença de células inflamatórias no ejaculado também pode influenciar no aumento dos defeitos de cauda dos espermatozóides (Aziz et al., 2010). Segundo Zalata e colaboradores (1998) e Lackner e colaboradores (2010), a presença de leucócitos no ejaculado está correlacionada ao aumento de defeitos espermáticos devido ao stress oxidativo que exerce nos fosfolípidios da membrana do espermatozóide causando desestabilização da mesma e alterando sua permeabilidade, em um processo similar ao que ocorre na criopreservação do espermatozóide (Alvarez & Storey, 1992).

6. CONCLUSÕES

- A vesícula seminal é um importante sítio de lesões causadas pela infecção por *B. ovis*, além das caudas dos epidídimos.

- Carneiros experimentalmente infectados pela *B. ovis* sofrem queda na qualidade do ejaculado, sendo as maiores alterações caracterizadas por queda na concentração espermática e aumento dos defeitos totais.

- Não foram observadas alterações de motilidade e vigor, o que pode estar associado ao tempo de infecção e severidade das lesões.

- A pesquisa de leucócitos no ejaculado, uma das primeiras alterações clínicas encontradas no presente trabalho, é uma importante ferramenta para o rastreamento dos processos infecciosos que acometem o sistema reprodutivo dos carneiros, e deve ser utilizada rotineiramente nas avaliações andrológicas dos ovinos.

- A ultrassonografia e a mensuração pelo paquímetro são métodos válidos para mensuração dos testículos e epidídimos. Porém, a ultrassonografia tem como vantagem a possibilidade de mensuração não invasiva das vesículas seminais de animais infectados com *B. ovis*. Porém, a ultrassonografia tem como vantagem a possibilidade de mensuração não invasiva das vesículas seminais de animais infectados com *B. ovis* e ser um método não invasivo de examinar o parênquima das vesículas seminais, testículos e epidídimos.

- A associação das técnicas de mensuração e a avaliação do parênquima testicular e epididimário pela ultrassonografia, avaliação seminal periódica e avaliação citológica do sêmen são ferramentas úteis para o rastreamento de carneiros com desordens inflamatórias nos órgãos do sistema reprodutivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, N.; NOAKES, D.E. A clinical and ultrasonographic study of induced testicular and epididymal lesions in goats and ram. *Animal Reproduction Science*, v.39, p.35-48, 1995.

- AHMAD, N.; NOAKES, D.E.; SUBANDRIO, A.L. B-mode real time ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of sheep and goats. *Veterinary Record*, v.128, p.491-496, 1991.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode sublethal criodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.13, n.3, p.232-241, 1992.
- ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P. Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams in Quebec. *Canadian Veterinary Journal*, v.45, p.312-313, 2004.
- ÁVILA, V.K.; COUTINHO, G.C.; KOROL, V.; RIBEIRO, A.O. Prevalência da brucelose ovina em carneiros no Estado de Santa Catarina. *Agropecuária Catarinense*, v.16, n.3, p.55-57, 2003.
- AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; ALVES, F.A.L.; CLEMENTINO, I.J.; BATISTA, C.S.A.; AZEVEDO, A.S. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Agropecuária Técnica*, v.25, n.2, p.45-50, 2004.
- AZIZ, N.; NOVOTNY, J.; OBORNA I., FINGEROVA, H.; BREZINOVA, J.; SVOBODOVA, M. Comparison of chemiluminescence and flow cytometry in the estimation of reactive oxygen and nitrogen species in human semen. *Fertility and Sterility*, 2010, in press.
- BAGLEY, C.V.; BURRELL, W.C.; ESPLIN, G.M.; WALTERS, J.L. Effect of epididymitis on semen quality of rams. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.185, n.8, p.876-877, 1984.
- BAGLEY, C.V.; PASKETT, M.E.; MATTHEWS, N.J.; STENQUIST, N.J. Prevalence and causes of ram epididymitis in Utha. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.186, n.8, p.798-801, 1985.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1 ed. Ames, IA, USA: Iowa State University Press, p.215-278, 1989.
- BARTH, A.D.; LEONEL, A.; AVILÉS, M.; ARTEAGA, A.A.; CAMPBELL, J.R.; HENDRICK, S.H. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. *Animal Reproduction Science*, v. 106, n. 3-4, p. 274-288, 2008.
- BARRON, S.J.; KOCAN, A.A.; MORTON, R.J.; THEDFORD, T.R.; MCCAIN, C.S. Susceptibility of male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Brucella ovis* infection. *American Journal of Veterinary Research*, v.46, n.8, p. 1762-1764, 1985.
- BIBERSTEIN, E.L.; MACGROWAN, B.J.; OLANDER, H.; KENNEY, P.C. Epididymitis in rams. Studies on pathogenesis. *Cornell Veterinarian*, v.57, p.27-41, 1964.
- BIBERSTEIN, E.L.; MCGOWAN B.J.; ROBINSON, E.A.; HARROLD, D.R. Epididymitis in rams. Studies on immunity. *Cornell Veterinarian*, v.52, p.214-227, 1962.
- BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: Nielsen K.; Duncan, JR. ed. Animal Brucellosis. Boca Raton, CRC Press, p.351-378, 1990.
- BLOBEL, H.; FERNANDES, J.C.T.; MIES FILHO, A.; RAMOS, A.A.; TREIN, E.J. Estudos sobre a etiologia da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, V.7, p.1-3, 1972.
- BREW, S.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; MACMILLAN, A.P.; STAUNTON, N.J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Veterinary Record*, v.24, p.483, 1999.
- BUCKRELL, B.C.; McEWEN, S.A.; JOHNSON, W.H.; SAVAGE, N.C. Epididymitis caused by *Brucella ovis* in a southern Ontario sheep flock. *Canadian Veterinary Journal*, v.26, n.10, p.293-296, 1985.

- CARPENTER, T.E.; BERRY, S.L.; GLENN, J.S. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: Computerized decision-tree analysis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.190, p.983-987, 1987.
- CARTEE, R.E.; RUMPH, F.P.; ABUZAIID, S.; CARSON, R. Ultrasonographic examination and measurement of ram testicles. *Theriogenology*, v.33, n.4, p.867-875, 1990.
- CELLI, J.; CHASTELLIER, C.; FRANCHINI D.; PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Medicine*, v.198, n.4, p.545-556, 2003.
- CERRI, D.; AMBROGI, C.; EBANI V.V.; POLI, A.; CAPPELLI, F.; CARDINI, G.; ANDREANI, E. Experimental *Brucella ovis* infection in Mouflon (*Ovis musimon*). *Journal of Wildlife Diseases*, v.38, n.2, p.287-290, 2002.
- CHANDOLIA, R.K.; BARTLEWSKI, P.M.; OMEKE, B.C.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C.; PIERSON, N.C. Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: Effects of a GnRH agonist. *Theriogenology*, v.48, p.99-117, 1997.
- CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE B.C.; PIERSON, R.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Assessment of development of the Testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*, v.48, n.1, p.114-132, 1997.
- CLEMENTINO, J.I.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; PAULIN, L.M.; MEDEIROS, K.A. Inquérito soro-epidemiológico e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em carneiros deslanados do semi-árido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.4, p.137-143, 2007.
- CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GREPINET, O.; BOUMEDINE, K.S. Classification of *Brucella* stains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR identification tests. *Microbes and Infection*, v.5, n.7, p.593-602, 2003.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA), *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*, p.31-34, 1998.
- COOK, J.L.; DEWBURY, K. The Changes seen on High-Resolution Ultrasound in Orchitis. *Clinical Radiology*, v.55, n.1, p.13-18, 2000.
- COSTA, F.L.A.; SILVA, S.M.M.S.; NASCIMENTO, E.F. Patologic evaluation of testis and epididymis of hairy rams in the semi-arid region of Piauí State. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.5, p.1110-1116, 2007.
- COULTER, G.H.; BAILEY, D.R.C. Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Theriogenology*, v.30, n.4, p.743-749, 1988.
- CRUZ, J.F.; FREITAS, V.J.F. A ultrasonografia em tempo real na reprodução de caprinos. *Ciência Animal*, v.11, n.1, p.53-61, 2001.
- CUPPS P.T.; BRIGGS, J.R. Changes in the epididymis associated with morphological changes in the spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, v.48, p.1241-1244, 1965.
- EILTS, B.E.; WILLIAMS, D.B.; MOSER, E.B. Ultrasonic measurement of canine testes. *Theriogenology*, v.40, p.819-828, 1993.
- FICAPAL, A.; JORDANAB, J.; BLASCO, J.M.; MORIYÓND, I. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Research*, v.29, n.1, p.13-19, 1998.
- GIFFIN, J.L.; FRANKS, S.E.; RODRIGUEZ-SOSA, J.R.; HAHNE, A.; BARTLEWSKI, P.M. A study of morphological and haemodynamic determinants or testicular echotexture characteristics in the ram. *Experimental Biology and Medicine*, v.7, p.794-801, 2009.

GOULETSOU, P.G.; AMIRIDIS, G.S.; CRIPPS, P.J.; LAINAS, T.; DELIGIANNIS, K.; SARATSIS, P.; FTHENAKIS, G.C. Ultrasonographic appearance of clinically healthy testicles and epididymides of rams. *Theriogenology*, v.59, p.1959-1972, 2003.

GOULETSOU, P.G.; FTHENAKIS, G.C.; CRIPPS, P.J.; PAPAIOANNOU, N.; LAINAS, T.; PSALLA, D.; AMIRIDIS, G.S. Experimentally induced orchitis associated with *Arcanobacterium pyogenes*: Clinical, ultrasonographic, seminological and pathological features. *Theriogenology*, v.62, p.1307-1328, 2004.

GOULETSOU, P.G.; GALATOS, A.D.; FTHENAKIS G.C. Clinical, ultrasonographic and pathological features following unilateral vasectomy in rams. *Animal Reproduction Science*, v.103, p.52-68, 2008.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *Journal of Animal Science*, v.70, p.953-972, 1992.

GUIMARÃES, A.S.G. *Caracterização da caprinovinocultura em Minas Gerais*. 2006. 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária preventiva). Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

HULL, B.L; VOGEL, S.R.; Seminal vesiculitis. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, v.24, p.267-272, 2008.

JAHANS, K.L.; FOSTER, G.; BROUGHTON, E.S. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Veterinary Microbiology*, v.57, n.4, p.373-382, 1997.

JANSEN, B.C. The aetiology of ram epididymitis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.47, p.101-107, 1980.

JANSEN, B.C. The pathology of bacterial infection of the genitalia in rams. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.47, p.263-267, 1980.

KARACA, F.; AKSOY, M.; KAYA, A.; ATAMAN, M.B.; TEKELI, T. Spermatic granuloma in the ram: Diagnosis by ultrasonography and semen characteristics. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.40, n.4, p.402-406, 1999.

KENNEDY, P.C.; FRAZIER, L.M.; McGOWAN, B. Epididymitis in rams: Pathology and bacteriology. *Cornell Veterinarian*, v.46, p.303-319, 1956.

LACKNER, J.E.; AGARWAL, A.; MAHFOUZ, R.; DU PLESSIS, S.S.; SCHATZL, G. The association between leukocytes and sperm quality is concentration dependent. *Reproductive Biology and Endocrinology*, p.8-12, 2010.

LOUTSEVITCH, N.E.S.; WHATMORE, A.M.; QUANCE, C.R.; KOYLASS, M.S.; CUMMINS, L.B.; DICK JR, E.J.; SNIDER C.L.; CAPPELLI, D.; EBERSOLE, J.L.; NATHANIELSZ, W.; HUBBARD, G.B. a novel *Brucella* isolate in association with two case of stillbirth in non-human primates ó first report. *Jornal of Medical Primatology*, v. 38, n.1, p. 70-73, 2009.

LUNASTRA, D.D.; SCHANBACHER, B.D. Testicular function and Leydig cell ultrastructure in long-term bilaterally cryptorchid rams. *Biology of Reproduction*, v.38, p.211-220, 1988.

MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.16, n.2/3, p.75-79, 1996.

MANUAL of standarts for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, cap .2.7.9. 2000. Disponível: < <http://www.oie.int> >. Acesso em 13/09/2008.

MARQUES, A.P. *Caracterização soroepidemiológica da infecção por vírus Maedi-visna e Brucella ovis em ovinos do estado de Minas Gerais*. 2006. 74 p. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária preventiva). Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

- McFARLANE, D.; SALISBURY, R.M.; OSBORNE, H.G; JEBSON, J.M.. Investigation into sheep abortion in New Zeland during the 1950 lambing season. *Australian Veterinary Journal*, v.28, p.221-226, 1952.
- MOREIRA, E.P.; MOURA, A.A.A.; ARAÚJO, A.A. Efeito da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.6, p.1704-1711, 2001.
- NIILO, L.; MACDONALD, D.W.; GODKING, G.F.; STONE, M.W. Ovine Brucellosis in Alberta. *Canadian Veterinary Journal*, v.27, n.6, p.245-249, 1986.
- NOZAKI, C.N.; MEGID, J.; LIMA, K.C.; SILVA JUNIOR, F.F.; VELOSO, C.S. Comparação das técnicas de Imunodifusão em Gel de Ágar e Elisa no diagnóstico de Brucellose ovina em cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo. *Arquivo Instituto Biológico*, v.71, n.1, p.1-5, 2004.
- RIDLER, A.L.; WEST, D.M. Effects of *Brucella ovis* infection on semen characteristics of 16-month-old red deer stags. *New Zealand Veterinary Journal*, v.50, n.1, p.19-22, 2002.
- RHYAN, J.C.; HOLLAND, S.D.; GIDLEWSKI, T.; SAARI, D.A.; JENSEN, A.E.; EWALT, D.R.; HENNAGER, S.G.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.E. Seminal vesiculitis and orchitis caused by *Brucella abortus* biovar 1 in young bison bulls from South Dakota. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.9, p.368-374, 1997.
- ROBLES, C.A. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinária*, v.79, n.1, p.67-71, 1998.
- ROBLES, C.A.; UZAL, F.A.; OLAECHEA, F.V.; LOW, C. Epidemiological observations in a corriedale flock affected by *Brucella ovis*. *Veterinary Research*, v.22, n.7, p.435-443, 2004.
- ROVAY, H. BARTH, A.D.; CHIRINO-TREJO, M.; MARTÍNEZ, M.F. Update on treatment of vesiculitis in bulls. *Theriogenology*, v.70, p.495-503, 2008.
- SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada a experimentação animal. 2º Ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ-Editora, 2002. 265 p.
- SANTOS, R.L.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. *Caderno Técnico de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.47, p.42-56, 2005.
- SANTOS, R.L.; SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.F.C.; VASCONCELOS A.C.; PESQUERO, J.L.; COELHO, S.G.; SERAKIDES, R.; REIS, S.R. Effect of growth hormone and induced IGF-1 release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. *Theriogenology*, v. 51, p. 975-984, 1999.
- SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; CANAVESSI, A.M.O.; KEMPINAS, W.G.; ROSA, G.J.M. Avaliações ultra-sonográfica, macroscópica e histológica da biopsia testicular em ovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.3, 2002.
- SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; DAHOUK, S.A.; MELZER, F.; KÄMPLFER, P.; NEUBAUER H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; FALSÉN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. Nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 2, p. 375-382, 2008.
- SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 801-808, 2010.

SIMMONS, G.C.; HALL, W.T.K. Epididymitis of rams. *Australian Veterinary Journal*, v.29, p.33-40, 1953.

SHON, A.H.; PROBERT, W.S.; GLASER, C.A.; GUPTA, N.; BOLLEN, A.W.; WONG, J.D.; GRACE, E.M.; MCDONALD, W.C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by marine mammal *Brucella* spp. *Emerging Infection Diseases*, v.9, n.4, p.485-488, 2003.

SWIFT, B.L.; WEYERTS, P.R.; Ram epididymitis. A study on infertility. *Cornell Veterinarian*, v.55, p. 204-214, 1969.

ÜLKER, H.; KANTER, M.; GÖKDAL, O.; AYGÜN, T.; KARAKUS, F.; SAKARYA, M.E.; DEAVILA, D.M.; REEVES J.J. Testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in ram lambs immunized against recombinant LHRH fusion proteins. *Animal Reproduction Science*, v.80, p.205-219, 2005.

VALLE FILHO, V.R. *Andrologia do touro*. 14 ed. Ed UFMG, 352p, 2007.

WALKER, R.L.; LEAMASTER, B.R.; STELLFUG, J.N.; BIBERSTEIN, E.L. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.188, n.4, p.393-396, 1986.

WATT, D.A. Testicular pathology of merino rams. *Australian Veterinary Journal*, v.54, p.473-478, 1978.

XAVIER, M. N., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciência Rural*, v. 39, p. 2252-2260, 2009.

XAVIER, M. N., SILVA, T. M. A., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., MOUSTACAS, V. S., CARVALHO JÚNIOR, C. A., SANTOANNA, F. M., ROBLES, C. A., GOUVEIA, A. M. G., LAGE, A. P., TSOLIS, R. M., SANTOS, R. L. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for detection of *Brucella ovis*

infection in rams. *Veterinary Microbiology*, 2010, in press.

ZALATA, A.A.; CHRISTOPHE, A.B.; DEPUYDT, C.E.; SCHOONJANS, F.; COMHAIRE, F.H. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v.21, p.154