

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PARÂMETROS CLÍNICOS, ALTERAÇÕES SOROLÓGICAS E
QUALIDADE DO SÊMEN DE TOUROS JOVENS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 1**

Wesley José de Souza
Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PARÂMETROS CLÍNICOS, ALTERAÇÕES SOROLÓGICAS E
QUALIDADE DO SÊMEN DE TOUROS JOVENS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 1**

Wesley José de Souza

Orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

Coorientador: Dr. Carlos Frederico Martins

Coorientador: Dr. José Robson Bezerra Sereno

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

S729p Souza, Wesley José
Parâmetros clínicos, alterações sorológicas e qualidade do
sêmen de touros jovens infectados experimentalmente com
herpesvírus bovino tipo 1 / Wesley José de Souza . -- Jaboticabal,
2013 xviii,
74 p. ; il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Samir Issa Sâmara
Banca examinadora: Luis Antonio Mathias, Iveraldo dos Santos
Dutra, Karen Martins Leão, Bruna Alexandrino
Bibliografia

1. Rinotraqueíte infecciosa bovina. 2. Doença reprodutiva. 3.
Virusneutralização. 4. Reação em cadeia pela polimerase. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.9:636:2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PARÂMETROS CLÍNICOS, ALTERAÇÕES SOROLÓGICAS E QUALIDADE DO SÊMEN DE TOUROS JOVENS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1

AUTOR: WESLEY JOSÉ DE SOUZA

ORIENTADOR: Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE ROBSON BEZERRA SERENO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS FREDERICO MARTINS


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA

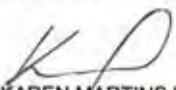
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS

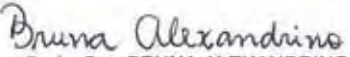
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. IVERALDO DOS SANTOS DUTRA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba


Profa. Dra. KAREN MARTINS LEAO

Instituto Federal Goiano / Rio Verde/GO


Profa. Dra. BRUNA ALEXANDRINO

Universidade Federal do Tocantins / Araguaína/TO

Data da realização: 05 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

WESLEY JOSÉ DE SOUZA – nascido em 16 de janeiro de 1968, no município de Goiânia – GO, filho de José Caetano de Souza e Alvina Santos de Souza. Ingressou em fevereiro de 1987 no Curso de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG), concluindo-o em dezembro de 1991. Posteriormente ingressou em março de 2000 no curso de mestrado em microbiologia animal do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), concluindo-o em maio de 2002. Atuou profissionalmente como Médico Veterinário na fazenda Codeara de janeiro a dezembro de 1992, na Fundação Bradesco de janeiro de 1993 a fevereiro de 1994, na empresa Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos entre setembro de 1994 e maio de 2000, no Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR) entre agosto de 2001 e agosto de 2006 e Posteriormente, foi aprovado no concurso do Instituto Federal Goiano - Campus – Urutaí em setembro de 2006 em uma vaga para professor da área de bovinocultura do Curso Técnico em Agropecuária, local onde trabalho até os dias de hoje. Em março de 2010 iniciou o Curso de Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV – UNESP – Jaboticabal.

DEDICO

Ào amado e inesquecível pai Jose Caetano de Souza (in memorian), que sempre me tratou com muita dignidade e carinho. Meu amor por você é por toda a vida. Viverá sempre no meu coração.

A minha querida mãe Alvina por todo amor e por me apoiar em momentos importantes da minha vida.

AGRADEÇO

A Deus, por me acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, José Caetano de Souza (in memoriam) e Alvina Santos de Souza que sempre me incentivaram a seguir em frente.

Ao meu filho Lucas pelo seu amor incondicional.

Ao meu irmão Gladstone e minha irmã Gleicileny pelo incentivo e amizade em todos os momentos de minha vida.

A todos os meus familiares pela força, solidariedade, conselhos, apoio moral e intelectual, durante toda a realização do meu trabalho.

A minha companheira Odília Alves Sardinha, pelo carinho em toda essa jornada.

Ao Prof. Dr. Samir Issa Samara por ter aceitado me orientar e pela disponibilidade do laboratório. Muito obrigado professor.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins e ao Prof. Dr. José Robson Sereno, por ter me ajudado em todas as etapas da pesquisa.

À Profa. Dra. Willia Marta Elsner Diederichsen de Brito, por ter me recebido com muita dedicação em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio Mathias, pela colaboração e sugestões feitas na qualificação e defesa dessa tese.

Ao Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, à Profa Dra. Lindsay Unno Gimenes e a Profa Dra. Sandra Possebon Gatti, pela colaboração e sugestões feitas na qualificação dessa tese.

Ao professor Dr. Iveraldo dos Santos Dutra e a Profa. Dra. Karen Martins Leão, pela colaboração e sugestões feitas na defesa dessa tese.

Ao meu amigo Messias, pela força e solidariedade em todos momentos da minha luta.

Aos meus amigos Francisco e Mazé pela amizade e preocupação comigo em todos os momentos da minha pesquisa.

À Bruna Alexandrino pela ajuda nos momentos iniciais da pesquisa. Te agradeço por toda minha vida.

À Andréa Souza Medeiros, pela ajuda na realização dos meus trabalhos no laboratório.

À Ingrid e a Lucimara pela força e incentivo na realização da minha pesquisa.

A Todos os alunos do curso técnico agropecuário do Instituto Federal Goiano ,Campus Urutái por ter me apoiado em todos os momentos do trabalho.

Aos alunos do curso de veterinária da UFG, Alisson e Viviane que me auxiliaram na realização das colheitas.

Ao Maurício e ao Zé Roberto pela força e companheirismo na minha chegada à Jaboticabal.

A minha amiga Danielle Godinho pela paciência em me escutar nos momentos de dificuldades. Você pode contar comigo em todos os momentos da sua vida.

Aos amigos Eliane e Marcos pelo incentivo nos momentos difíceis da pesquisa.

Aos meus amigos, Leandro, Rogério, João Pedro e minha amiga Maria por ter me auxiliado em várias etapas da pesquisa.

Aos meus amigos Jotho e Helena pelo companheirismo em todos os momentos de minha pesquisa.

SUMÁRIO

Página

COMISSÃO DE ÉTICO NO USO DE ANIMAIS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 O Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)	2
2.1.1 Características gerais	2
2.1.2 Transmissão	3
2.1.3 Patogenia e latência	4
2.2 Manifestações causadas pelo herpesvírus bovino tipo 1	5
2.2.1 Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)	5
2.2.2 Balanopostite / vulvovaginite	6
2.2.3 Outras formas e manifestações	7
2.3 Diagnóstico da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	8
2.4 Prevalência	11
2.5 Controle e Erradicação do Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)	15
2.5.1 Vacinas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	17
2.5.2 Programas de monitoração do BoHV-1 em centrais de colheita de sêmen bovino	18
2.6 Avaliação das características seminais	21
2.6.1 Avaliação de características físicas do sêmen	22
2.6.2 Avaliação da morfologia espermática	23
2.6.3 Avaliação de integridade de membrana plasmática, acrossomal e capacitação	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Caracterização dos Animais do Experimento	27
4.2 Amostragem	28
4.3 Inoculação Viral	28
4.4 Avaliação clínica dos touros inoculados	28
4.5 Colheita de Sangue	28
4.6 Procedimentos de Análise Sorológica	29

4.6.1	Manutenção das culturas celulares	29
4.6.2	Multiplicação viral	29
4.6.3	Titulação viral.....	30
4.6.4	Pesquisa de anticorpos neutralizantes	31
4.7	Procedimentos de Análise de Sêmen	32
4.7.1	Colheita de amostras de sêmen	33
4.7.2	Testes no sêmen fresco	34
4.7.3	Cálculo da concentração espermática.....	34
4.7.4	Envase do sêmen	35
4.7.5	Descongelamento das amostras	35
4.7.6	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	35
4.7.7	Avaliação da morfologia espermática	36
4.7.8	Análise de integridade de membrana plasmática e acrossoma.....	37
4.8	Exame anátomo-histopatológico dos testículos e epidídimos.....	38
4.9	Análise estatística	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Monitoração da temperatura corpórea.....	40
5.2	Monitoração dos sinais clínicos	41
5.3	Reação de vírusneutralização (VN)	44
5.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	45
5.5	Volume e Concentração Seminal	48
5.6	Motilidade Espermática.....	50
5.7	Vigor Espermático	52
5.8	Defeitos Espermáticos.....	54
5.9	Avaliação de Integridade da Membrana	56
5.10	Avaliação de integridade de acrossomo	57
5.11	Exame Anátomo-histopatológico dos Testículos e Epidídimos.....	60
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS.....	62



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 014030/11 do trabalho de pesquisa intitulado "Impacto na qualidade espermática de bovinos infectados experimentalmente com os vírus da rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR) e diarreia viral bovina (BVDV)", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Samir Issa Samara está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2011.

Jaboticabal, 11 de julho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Recabi - 24/11/2011 Wesley José de Souza

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Ampéres

BoHV-1 – Herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-1.1 – Herpesvirus bovino tipo 1 subtipo 1

BoHV-1.2 - Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 2

BoHV-1.2a – Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 2a

BoHV-1.2b - Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 2b

BoHV-5 - Herpesvirus bovino tipo 5

bp – Pares de bases

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

BVDV – Vírus da diarreia viral bovina

BRSV - Vírus respiratório sincicial bovino

C-FDA – Diacetato de 6 carboxifluoresceína

cm² - Centímetro quadrado

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desorribonucleotídeo trifosfatado

EC – Efeito citopático

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FITC – Isoticianato de fluotresceína

GLM – General linear model

HAP – Hemoaglutinação passiva

IA – Inseminação artificial

IBR – Rinotraqueíte infecciosa bovina

IF – Imunofluorescência

IFD – Imunofluorescência direta

IFI – Imunofluorescência indireta

IHQ – Imuno-histoquímica

IgM - Imunoglobulina M

IP – Iodeto de propídeo

IPV – Vulvovaginite pustular infecciosa

IPB – Balanopostite pustular infecciosa

IRS – Segmento de repetição interna
kbp – Kilopares de bases
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
Mgcl₂ - Cloreto de Magnésio
MDBK – Madin & Darby bovine kidney
MEM - Minimum Essential Medium
mL – Mililitro
nm – Nanômetro
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
p - Prevalência
PCR - Reação em cadeia pela polimerase
PI – Pós-inoculação
PIB – Produto Interno Bruto
PNA – *Penaut agglutinin*
PSA - *Psium sativum*
SFB – Soro fetal bovino
SPTZ - Espermatozoide
TCID₅₀ – Doses infectantes para 50,0% dos cultivos celulares
TRS – Segmento de repetição terminal
UL – Segmento longo único
UnB – Universidade de Brasília
UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
US – Segmento curto único
VN – Virusneutralização
µL – Microlitro
µm – Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Prevalência do BoHV-1 em diversos países	12
Tabela 2.	Prevalência do BoHV-1 em diversos estados brasileiros.	14
Tabela 3.	Temperatura corpórea dos grupos de touros controle (números 1 a 6) e inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1, medida durante 14 dias.	40
Tabela 4.	Sinais clínicos no grupo de touros controle (números 1 a 6) touros e inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1, monitorados durante 17 dias do experimento.	41
Tabela 5.	Títulos de vírusneutralização de amostras sanguíneas colhidas ao longo do tempo de touros do grupo controle (números 1 a 6) e do grupo de touros inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1	44
Tabela 6.	Resultados da PCR em de amostras de sêmen de touros do grupo controle (números 1 a 6) e do grupo de touros inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1.	46
Tabela 7.	Média \pm desvio padrão do volume (mL) e concentração espermática no sêmen fresco do grupo de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.	48
Tabela 8.	Média \pm desvio padrão das porcentagens de motilidade de espermatozoides no sêmen fresco e pós-descongelamento proveniente do grupo de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1	50
Tabela 9.	Médias \pm desvio padrão da escala (0 a 5) de vigor de espermatozoides, no sêmen fresco e após descongelamento proveniente dos grupos de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.	52
Tabela 10.	Médias \pm desvio padrão das porcentagens de defeitos maiores, defeitos menores e totais de espermatozoides do grupo de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.	54

- Tabela 11.** Médias \pm desvio padrão das porcentagens da integridade de membrana plasmática de espermatozoides do grupo de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.56
- Tabela 12.** Média \pm desvio padrão das porcentagens de espermatozoides vivos, sem reação acrossomal (S/R/A) e com reação acrossomal (C/R/A) e mortos (S/R/A) e (C/R/A) do sêmen dos grupos de touros controle (C) e inoculados (I) com o BoHV-1.58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplo de manifestação com edema, hiperemia, e úlceras no prepúcio, após 8 dias de inoculação com o BoHV-1 do touro número 7.43
- Figura 2.** Exemplo de manifestação com exsudato nasal, após 7 dias de inoculação com o BoHV-1 do touro número 9.43
- Figura 3.** Análise para detecção do material genético viral, por eletroforese em gel agarose com 2% de brometo de etídeo, dos produtos (160pb) amplificados pela PCR em amostras de sêmen do grupo de touros (C) controle (números 1 a 6) e (I) inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1.47
- Figura 4.** Espermatozóides corados com C-FDA e IP, demonstrando membrana plasmática íntegra (A) de touro controle e (A`) de touro inoculado com o BoHV-1; membrana plasmática lesada (B) de touro controle e (B`) de touro inoculado observados em microscópio de epifluorescência aumento de 600x..57
- Figura 5.** Fotografia em microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2) do mesmo campo de leitura. Espermatozoide vivo com acrossoma íntegro (A) do touro controle e (A´) do touro inoculado com o BoHV-1 visualizado no contraste de fase (1) não se apresenta corado com a conjugação de FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim PNA e IP quando avaliado em epifluorescência (2). Espermatozoide mortos com acrossoma reagido (B) do touro controle e (B´) do touro inoculado visualizado no contraste de fase (1) apresenta-se corado com IP-PNA em epifluorescência (2) em aumento de 400x..59

PARÂMETROS CLÍNICOS, ALTERAÇÕES SOROLÓGICAS E QUALIDADE DO SÊMEN DE TOUROS JOVENS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo analisar parâmetros clínicos, alterações sorológicas e qualidade do sêmen de touros jovens infectados experimentalmente com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) entre os dias 0 e 49 pós-inoculação (PI), com o intuito de caracterizar as manifestações que direcionam o diagnóstico, nas diversas fases de infecção. Neste experimento foram utilizados 12 touros com aproximadamente 30 meses de idade. Seis animais foram inoculados com a amostra padrão Nebraska do BoHV-1 pelas vias intranasal e intraprepucial com 10 mL de suspensão viral ($10^{7,0}$ TCID₅₀/mL) repartidos 5 mL em cada via. Os outros seis animais ficaram como grupo controle. Todos os touros inoculados com o BoHV-1 apresentaram edema e hiperemia no prepúcio entre o terceiro e o décimo sexto dia pi, dos quais dois também apresentaram exsudato nasal, detectado entre o terceiro e o oitavo dia PI. Nenhum dos animais do grupo controle manifestou sinais clínicos da doença. Por meio da técnica de virusneutralização (VN) foram detectados títulos de anticorpos com valores entre 4 e 512 em todos os animais inoculados, no período entre 14º e 49º dia PI. Em todos os animais inoculados foi constatada a presença de material genético do BoHV-1 nas amostras de sêmen analisadas por meio da técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Em quatro desses animais foi detectado o material genético viral aos 7,14 e 21 dias PI e em dois animais o material genético do vírus foi identificado por mais uma semana, ou seja, até o 28º dia PI. Todos os animais do grupo controle apresentaram resultados negativos nas técnicas de VN e PCR. Em relação à qualidade do sêmen, não foram observadas diferenças estatísticas ($p \geq 0,05$) entre o grupo de touros controle e o grupo de touros inoculados experimentalmente com o BoHV-1, por meio das análises do volume, da concentração, da motilidade, do vigor e dos defeitos espermáticos, assim como por meio das análises da integridade dos acrossomos e membranas dos espermatozoides com sondas fluorescentes. Os epidídimos e os testículos dos dois grupos de touros não apresentaram alterações histopatológicas dignas de nota.

Palavras-chave: rinotraqueíte infecciosa bovina, doença reprodutiva, virusneutralização, reação em cadeia pela polimerase, qualidade espermática

CLINICAL PARAMETERS, SEROLOGICAL ALTERATIONS AND QUALITY FROM SEMEN OF YOUNG BULLS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH 1 BOVINE HERPES VIRUS

ABSTRACT – This study aimed to analyze clinical parameters, serological alterations and quality from the semen of young bulls experimentally infected with type 1 bovine herpes virus (BoHV-1) between days 0 and 49 post-inoculation (P. I.), in order to characterize the manifestations that orientate diagnosis, in several phases of infection. Twelve bulls were used in this experiment, all being approximately 30 months old. Six animals were inoculated with the Nebraska standard sample of BoHV-1 through intranasal and intrapreputial routes, each with 10 ml of the viral suspension (total dosage of $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml) divided in 5 ml for each route. The other six animals were used as a control group. All bulls inoculated with BoHV-1 presented edema and hyperemia on the foreskin between the third and sixteenth days after the inoculation, from which two animals also presented nasal exudate, detected between the third and eighth days P. I. No animals from the control group manifested any clinical signs characteristic of the infection caused by BoHV-1. By means of the viral neutralization (VN) technique, antibody titers with values ranging from 4 to 512 were detected in all inoculated animals between days 14 and 49 after the inoculation. In all inoculated animals, genetic material of BoHV-1 was present in semen samples analyzed by means of the polymerase chain reaction (PCR) technique. In four of these animals, viral genetic material was detected on days 7, 14 and 21 P. I. and in two animals the genetic material of the virus was identified for one more week, until day 28 after the infection. All animals in the control group showed negative results for the previously mentioned VN and PCR techniques. Considering the quality of semen samples from experimental bulls, no statistical differences were observed ($p \geq 0.05$) between the control group and the group of bulls inoculated with BoHV-1, detected by means of volume, concentration, motility, liveliness and spermatid defects analysis, as well as analysis of the integrity of acrosomes and spermatozoon membrane, utilizing fluorescent probes. The epididymis and testis of bulls belonging to both experimental groups showed no histopathological changes that were noteworthy.

Keywords: Bovine infectious rhinotracheitis, reproductive illness, viral neutralization, polymerase chain reaction, spermatid quality.

1 INTRODUÇÃO

A expansão da pecuária no Brasil tem revelado sua importância como um dos principais componentes de receita do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Entretanto o reflexo desta expansão se deve, entre outros fatores, aos programas de acasalamento dirigido utilizando a monta natural, a inseminação artificial e diversas outras biotecnologias de reprodução. Todavia o sucesso das técnicas depende da saúde reprodutiva dos machos e fêmeas utilizados nestes programas.

O índice de natalidade de um rebanho bovino pode ser diretamente influenciado pelo estado sanitário e nutricional dos animais em fase de reprodução. Doenças infecciosas, de origem bacteriana, viral ou parasitária, podem afetar o sistema reprodutivo, tanto dos machos como das fêmeas, causando uma série de problemas de infertilidade com diferentes níveis de interferência. Dentre as doenças virais mais importantes que afetam a esfera reprodutiva já identificada em bovinos no Brasil desde a década de 1960, destaca-se a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), virose cuja a origem no rebanho nacional foi relacionada à importação de animais infectados com o BoHV-1 e de sêmen contaminado.

O material genético adquirido por criadores brasileiros que utilizam a inseminação artificial é oriundo de empresas que submetem obrigatoriamente os animais a testes sorológicos exigidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para um grupo de patógenos, conforme a Instrução Normativa número 40; no entanto, os animais utilizados por produtores para realizar a monta natural, quando muito, são submetidos apenas aos diagnósticos de brucelose e tuberculose.

Pelo fato do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) estabelecer rapidamente latência, ser transmitido pelo sêmen e provocar uma série de desordens reprodutivas e respiratórias em bovinos, tanto em machos como em fêmeas, o diagnóstico da infecção por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) deveria ser priorizado nos programas de prevenção às doenças da esfera reprodutiva. No entanto, alguns estudos ainda são necessários para ampliar os conhecimentos sobre diagnósticos. Dentre os mais frequentes estão as alterações detectáveis nos exames auxiliares, conforme a evolução da enfermidade, que podem facilitar a definição de estratégias de combate à infecção pelo BoHV-1.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)

2.1.1 Características gerais

O BoHV-1 que pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaerpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, também é conhecido como vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) (FENNER; GIBBS; MURPHY, 1993).

A partícula viral tem entre 70 e 110 nm de diâmetro e é constituída por um capsídeo icosaédrico (100 nm), contendo DNA linear de fita dupla. A dupla cadeia de desoxirribonucleotídeos está organizada em um segmento de 104 kpb, denominado UL (Segmento longo único) e um segmento de 10 Kpb denominado US (Segmento curto único) sendo este último flanqueado por um segmento de IRS (Segmento de repartição interna) e TRS (Segmento de repartição terminal) invertidos, cada um contendo 11 Kpb, totalizando 136 Kpb (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996). Esta fita dupla é rodeada pelo tegumento, que, por sua vez, é revestido por envelope lipoproteico (120-200 nm), no qual se localizam dez glicoproteínas (FENNER; GIBBS; MURPHY, 1993). As glicoproteínas são denominadas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL e gM. Cada uma delas diferencia-se em sua propriedade antigênica, molecular e função biológica nos processos de interação com a célula hospedeira e de replicação (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

As glicoproteínas do BoHV-1 diferenciam-se em suas propriedades antigênicas, moleculares e função biológica nos processos de interação com a célula hospedeira e de replicação (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996). Três glicoproteínas do envelope gB, gC e gD devido a sua localização e função biológica, possuem grande potencial imunogênico. A gB é a mais imunogênica e, durante a replicação viral, está envolvida nas etapas de adsorção, penetração e fusão celular (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996). A gC é muito importante na indução de anticorpos neutralizantes, sendo-lhe atribuída a função de adsorção do vírus à célula hospedeira, e a gD é uma glicoproteína essencial para a replicação viral e sugere-se que também esteja envolvida na adsorção, na penetração e na fusão celular (FENNER; GIBBS; MURPHY, 1993)

Embora seja considerado apenas um sorotipo, o BoHV-1 pode ser diferenciado por particularidades do DNA, quando digerido com endonucleases, em

dois subtipos, BoHV1-1 e BoHV1-2, e este último em subgenótipos 2a e 2b. Apesar de não existir nenhuma associação absoluta entre subtipo e quadro clínico, amostras do subtipo 1 primariamente causam infecções respiratórias, enquanto as do subtipo 2 estão associadas mais a infecções genitais (D'OFFAY et al., 1995).

2.1.2 Transmissão

Anticorpos contra BoHV-1 podem ser encontrados em bovinos e outras espécies domésticas, como suínos, ovinos, caprinos e búfalos, ou selvagens, como elefantes e cervos. A prevalência apresenta alta variação, dependendo do tamanho do rebanho e das condições de manejo (TEIXEIRA, 1998; STRAUB, 1991).

A principal fonte de infecção do BoHV-1 é a espécie bovina (KAHRS, 1997). Conforme Wentik et al. (1993), somente bovinos são disseminadores de BoHV-1, apesar da comprovação de infecções naturais e experimentais em ovinos, caprinos e suínos, porém não exercem papel importante na disseminação do vírus.

O BoHV-1, assim como outros herpesvírus de ruminantes, é transmitido diretamente por aerossóis, por contato entre animais infectados e susceptíveis, ou ainda pela via venérea (ENGELS; ACKERMANN, 1996). Mars et al. (2000a) demonstraram que o BoHV-1 foi transmitido pelo ar a partir de bezerros inoculados experimentalmente para bezerros susceptíveis sob condições de campo, por uma distância de pelo menos 4,4 m; além disso, estimaram uma distância de 6,2 metros para reduzir o risco de infecção, o que deve ser levado em consideração nos programas de erradicação da infecção pelo BoHV-1.

A transmissão indireta pode ocorrer via água ou alimento contaminado, pelo sêmen, pela colheita e transferência de embriões e ainda através de ordenhadeiras (ENGELS; ACKERMANN, 1996). A transmissão do BoHV-1 pelo sêmen tem sido amplamente favorecida pelo desenvolvimento de processos de criopreservação, uma vez que as condições de processamento e armazenamento desse material são ideais para a preservação do vírus (ROCHA, 1999).

Van Schaik et al. (1998) estudaram alguns dos fatores de risco para a existência de anticorpos contra o BoHV-1 e observaram que nas propriedades onde introduziam novos animais, que participavam mais frequentemente de exposições agropecuárias apresentavam maior frequência de animais soropositivos. Além disso,

foi observado que o trânsito de pessoas dentro e entre propriedades é um fator de risco para a ocorrência da infecção.

É importante ressaltar que o animal, uma vez tendo sofrido infecção primária, torna-se portador do BoHV-1 por toda a sua vida, atuando daí em diante como potencial fonte de infecção para os suscetíveis (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991; PITUCO et al., 1997).

Bezerros nascidos de novilhas primíparas inoculadas de forma experimental com BoHV-1, que algumas vezes resultam em infecções fetais não letais, podem ter anticorpos contra BoHV-1 e não terem sinais da doença, porém, por serem latentemente infectados, podem eliminar o vírus quando estressados, tornando-se fonte potencial de disseminação (MILLER, 1991).

Outra forma já relatada de surtos desta enfermidade foi pela utilização de vacinas atenuadas, porém esta probabilidade é altamente remota (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991).

2.1.3 Patogenia e latência

As portas de entrada do BoHV-1 no organismo são a mucosa da cavidade nasal, da orofaringe, a conjuntiva e a mucosa do trato genital (MUYLKENS et al., 2007). Geralmente, a primeira replicação do vírus acontece nas células epiteliais da porta de entrada. Devem ser considerados pelo menos dois tipos de infecção do vírus no organismo infectado: a infecção restrita à porta de entrada e a infecção disseminada gerada tanto por viremia quanto por via neuronal (ENGELS; ACKERMANN, 1996).

Na infecção restrita ao local de penetração no organismo animal, os sinais clínicos da doença são principalmente atribuídos à destruição das células devido à replicação do vírus, e títulos mais altos do vírus são produzidos e excretados neste estágio da infecção. Tendo em vista a resposta imune, estas infecções são geralmente autolimitantes, com recuperação dentro de duas a três semanas. As lesões locais, contudo, facilitam infecções bacterianas secundárias, que podem causar problemas mais sérios, como pneumonia (ENGELS; ACKERMANN, 1996).

Na disseminação sistêmica (viremia), há inicialmente replicação nos linfonodos e passagem do BoHV-1 para a corrente sanguínea, onde pode infectar monócitos ou se ligar a linfócitos, que também servem como veículos, pelo menos até que os

anticorpos neutralizantes estejam presentes. Enterite causada por uma infecção pelo BoHV-1 pode servir de exemplo desse tipo de disseminação (ENGELS; ACKERMANN, 1996). Na disseminação neuronal, os vírus penetram nos axônios das células nervosas durante a replicação inicial na porta de entrada. Os vírus então, através de um transporte intra-axonal, alcançam os corpos de neurônios no gânglio regional, onde estabelecem a latência (WINKLER; DOSTER; JONES 2000).

Segundo diversos autores (BARBOSA et al., 2005; SOLIS-CALDERON et al., 2005; VAN SCHAIK et al., 2002; VAN SCHAIK et al., 1998), o fator mais importante de risco associado à disseminação da doença é a introdução no rebanho de animais em período de incubação, em fase aguda ou latentemente infectados pelo vírus.

Após a infecção primária, o BoHV-1 tem a capacidade de permanecer em estado de latência, em gânglios periféricos, sem se replicar, por toda a vida do animal. Este mecanismo, quando é interrompido, justifica os períodos de uma nova excreção viral, acompanhados ou não de sinais clínicos (ACKERMANN et al., 1990). Este portador do vírus latente pode sofrer reativação com possível eliminação do vírus, porém na maioria das vezes sem provocar doença no animal, pois geralmente ele possui imunidade suficiente para prevenir os sinais clínicos (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991; PITUCO et al., 1997).

Uma vez infectados pelo BoHV-1, os animais serão portadores do vírus e potenciais disseminadores da doença no rebanho por toda a vida (STRAUB, 1991). O mecanismo de indução da latência viral ainda não é totalmente conhecido, porém sabe-se que durante a reativação o BoHV-1 é transportado via nervosa, a partir dos gânglios periféricos, retornando ao foco primário da infecção. Neste local ocorre replicação e eliminação viral. Casos de reativação do BoHV-1 foram observados em animais submetidos ao tratamento com corticosteroides ou a condições variadas de estresse (CIACCI-ZANELA et al., 1999). Durante o período de latência não são sintetizadas proteínas virais. Consequentemente, devido a não apresentação de antígenos do BoHV-1 ao sistema imunológico, pode ocorrer decréscimo no título de anticorpos neutralizantes (ACKERMANN et al., 1990).

2.2 Manifestações causadas pelo herpesvírus bovino tipo 1

2.2.1 Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)

A forma respiratória do BoHV-1 é conhecida como IBR, que pode não

apresentar sinais clínicos ou apresentar sinais que variam de brandos até doença severa. As lesões são limitadas ao trato respiratório, os animais apresentam febre alta, anorexia, corrimento nasal seroso ou sero-hemorrágico e posteriormente purulento, inflamação das narinas, pústulas e erosões da mucosa nasal (RIET-CORREA et al., 1996; KAPIL; BASARABA, 1997).

Outros sintomas associados à forma respiratória da doença são: rinite; respiração rápida; dispneia associada a material mucopurulento nas passagens nasais e traqueia; dilatação das narinas (KAHRS; SMITH, 1965); tosse e queda na produção de leite (ROCHA, 1999). Frequentemente a inflamação da conjuntiva acompanha a forma respiratória clássica da IBR (KAHRS, 1997). A descarga ocular, inicialmente clara, pode tornar-se mucopurulenta, usualmente bilateral, com fotofobia (RIET-CORREA et al., 1996). O corrimento ocular pode marcar os pelos da pálpebra inferior e a face de forma bastante evidente. A córnea usualmente não é afetada, mas em alguns casos podem ocorrer ceratite e ulceração, devidas principalmente a infecções secundárias. Nos casos não complicados, há uma regressão do quadro clínico em cinco a dez dias (FENNER; GIBBS; MURPHY, 1993; RIET-CORREA et al., 1996; KAHRS, 1997).

O coeficiente de letalidade geralmente é baixo nesta forma respiratória, no entanto, este número pode aumentar quando o quadro é complicado com infecções bacterianas secundárias ou infecções víricas superpostas (KAHRS, 1997).

2.2.2 Balanopostite / vulvovaginite

No macho, a forma genital do BoHV-1 é denominada de balanopostite pustular infecciosa (IPB), caracterizada pela presença de pequenos nódulos avermelhados ou pequenas pústulas de até 2 mm na mucosa do prepúcio e do pênis. Com a evolução da doença a mucosa peniana torna-se hiperêmica, com sensibilidade aumentada, podendo o animal apresentar micção frequente e incapacidade para monta (ROCHA, 1999).

O BoHV-1 pode replicar-se na mucosa prepucial e na uretra, contaminando o sêmen durante a ejaculação, quando o líquido seminal passa sobre as mucosas infectadas (ROCHA, 1999; GIVENS; MARLEY, 2008). A fase aguda da enfermidade tem um curso clínico de quatro a sete dias, e as lesões são curadas em dez a 14 dias, sempre quando não há complicações. Muitos casos são subclínicos ou

inaparentes e podem passar despercebidos (PUENTE, 2003). A infecção assume importância maior em touros usados para inseminação artificial, já que o vírus é eliminado pelo sêmen e, desta forma, pode ser transmitido para fêmeas suscetíveis (ROCHA, 1999; BARBOSA et al., 2005).

Na fêmea, a forma genital do BoHV-1 recebe a denominação de vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), com a mucosa genital apresentando desde nódulos até lesões extensivas do tipo vesiculares, erosivas e ocasionalmente ulcerativas, as quais causam relutância ao coito. Dependendo da severidade dos sinais clínicos, a recuperação ocorre dentro de 1 a 2 semanas (ROCHA, 1999).

A consequência mais séria relatada da IPV é o prolapso uterino devido à tensão causada pela dor associada a lesões extensivas (ROCHA, 1999). Miller (1991) observou que, quando o vírus penetra no útero por inseminação artificial com sêmen contaminado, há o desenvolvimento de uma endometrite necrosante localizada, causando infertilidade temporária que perdura por 1 a 2 semanas. Após esta exposição intrauterina ao vírus, há também uma ooforite necrosante severa, mas que após a recuperação da infecção não deixa danos permanentes nas funções ovarianas.

2.2.3 Outras formas e manifestações

Depois de replicar-se na porta de entrada (mucosas oro-nasal, ocular, genital) o BoHV-1 começa a circular na corrente sanguínea e produz aborto em vacas prenhes, nas quais o vírus, durante a viremia, atravessa a placenta, infecta o feto e causa aborto subsequente à morte fetal (MILLER, 1991). O BoHV-1 pode também causar, com pouca frequência, uma forma neurológica em bezerros que se caracteriza por depressão profunda, incoordenação, tremores, convulsões com período de excitação e movimentos de pedalagem. Esses sinais são geralmente seguidos por colapso físico e mental, coma e morte. As lesões histopatológicas incluem meningoencefalite não supurativa, necrose neuronal, malácia focal e frequentemente inclusão intranuclear em artrócitos (BARBOSA et al., 2005).

Uma forma sistêmica da enfermidade aparece em neonatos que sofreram exposição no final da gestação ou logo após o nascimento. Esses neonatos apresentam uma forma aguda de infecção pelo BoHV-1, demonstrando problemas respiratórios, lesões necróticas na mucosa oral, língua, esôfago e nos compartimentos

gástricos, com ou sem diarreia, geralmente culminando na morte do animal. Há também casos descritos em que a forma respiratória aparece associada à forma ocular ou à balanopostite e à vulvovaginite (RIET-CORREA et al., 1996).

2.3 Diagnóstico da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

O diagnóstico da infecção pelo BoHV-1 não deve ser fundamentado apenas nos sinais clínicos, pois, apesar de presuntivos e por não serem patognômicos, devem então ser confirmados por exames laboratoriais. O diagnóstico com apoio laboratorial deve buscar o isolamento e a identificação do vírus ou de componentes virais e de anticorpos específicos (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991; Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2013).

Na identificação do agente, o melhor método diagnóstico é o isolamento do vírus em cultivo celular (OIE, 2013), entretanto esta técnica é muito laboriosa, pois demanda tempo, exige a manutenção de cultivos celulares e depende da presença do vírus infeccioso na amostra teste, fato que dificulta sua utilização rotineira (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991). Estando o laboratório adequado, o BoHV-1 cresce bem em uma grande variedade de células como as de rim, pulmão e testículo de bovino, células derivadas de pulmão fetal, traqueia ou ainda em linhagens estabelecidas como a Madin & Darby bovine kidney (MDBK) (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

Os espécimes clínicos colhidos para exame geralmente são secreções nasais e genitais, lavado prepucial, fragmentos de mucosa do trato respiratório e fragmentos de órgãos como amígdalas, pulmões e linfonodos braquiais. Em casos de abortamentos, o fígado, pulmão, baço e rim do feto ou os cotilédones placentários são utilizados (OIE, 2013). Relato de Batista et al. (2010) mostraram a possibilidade de isolar também o BoHV-1 de encéfalos bovinos. Já o isolamento do vírus no sêmen necessita de algumas etapas laboratoriais especiais, pois o fluido seminal contém enzimas e outros fatores que são tóxicos para às células e inibem a replicação viral (ROCHA, 1999; OIE, 2013).

O isolamento viral em culturas celulares permite a visualização de efeito citopático característico do BoHV-1, que aparece, geralmente, três dias após a inoculação e é caracterizado pelo arredondamento das células, semelhante a cachos de uva amontoados ao redor de áreas de lise na monocamada celular.

Algumas vezes, células gigantes com diversos núcleos podem também ser observadas. Após sete dias, se nenhum efeito citopático aparecer, uma passagem cega deve ser feita. Para tal, primeiro congela-se a cultura celular inoculada e depois descongela-se e clarifica-se por centrifugação. O sobrenadante é, então, utilizado para inoculação em outro sistema de monocamadas celulares (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; OIE, 2013).

Para identificação de vírus que produz o efeito citopático como o BoHV-1, o sobrenadante da cultura pode ser neutralizado com antissoro poli ou monoclonal anti-BoHV-1, antes de ser inoculado em nova cultura celular, ou submetido a técnicas sorológicas como imunofluorescência (IF), ensaio imunoenzimático (ELISA) ou técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; OIE, 2013).

O isolamento do vírus deve ser interpretado, pois isso não necessariamente significa que é a causa do aparecimento da doença, pois existe a possibilidade de um vírus latente ser reativado devido a condições de estresse. Já o diagnóstico sorológico confirmatório necessita ser feito em duas colheitas que resultem na soroconversão do resultado negativo para positivo, com quatro vezes ou mais o aumento do título de anticorpos para BoHV-1 em amostras de soro pareadas (OIE, 2013).

As técnicas sorológicas de IF, IHQ e ELISA também podem ser utilizadas para detecção direta do antígeno viral nas amostras clínicas. As vantagens dos métodos de detecção de antígeno sobre o isolamento viral são o não requerimento de cultivos celulares e a rapidez do diagnóstico, que pode ser dado em apenas um dia, porém suas desvantagens são maior custo e menor sensibilidade (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; OIE, 2013).

O diagnóstico da infecção por detecção de anticorpos contra o BoHV-1 pode ser feito por diferentes técnicas sorológicas. Segundo a OIE (2013), os resultados desses testes podem ser usados para diferentes propósitos: (a) diagnosticar uma infecção aguda por meio de detecção de soroconversão; (b) demonstrar a ausência da infecção, com exigência de atestado negativo para o comércio internacional de animais; (c) determinar a prevalência da infecção em estudos soropidemiológicos; (d) dar suporte aos programas de erradicação e subsequente vigilância; (e) avaliar a resposta de anticorpos após uma vacinação ou uma infecção experimental.

As técnicas sorológicas comumente utilizadas na identificação de anticorpos contra o BoHV-1 são: virusneutralização (VN); ELISA; imunofluorescência direta

(IFD); imunofluorescência indireta (IFI); e hemaglutinação passiva (HAP) (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; PUENTE, 2003).

As técnicas de VN e ELISA são as mais utilizadas para detecção de anticorpos contra o BoHV-1. A identificação de problemas clínicos causados pelo BoHV-1, por meio de provas sorológicas, só pode ser realizada por sorologia pareada quando se evidencia aumento no título de anticorpos VN presentes em amostras de soro do mesmo animal, colhidas com intervalo de três a quatro semanas. Essas técnicas são incapazes de diferenciar animais vacinados de animais expostos ao vírus de campo. Esses animais, assim como os animais com a infecção na forma latente, apresentarão uma flutuação no título de anticorpos, com tendência a queda ao longo do tempo (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

O teste de VN mesmo padronizado apresenta algumas variações. Pode variar com relação à amostra viral, à diluição inicial do soro, ao período de incubação vírus/soro (uma a 24 horas), ao tipo de célula utilizada e ao dia da leitura final (OIE, 2013). De todas essas variações, o período de incubação vírus/soro é a que mais influencia a determinação do título de anticorpos. Um período de incubação de 24 horas pode aumentar a sensibilidade da técnica em até 16 vezes com relação ao título final de anticorpos, quando comparado ao período de incubação de uma hora (BELKNAP et al., 1994; BARBOSA et al., 2005; ALEXANDRINO, 2008; YESILBAG; GUNGOR, 2008; KAMPA et al., 2009; AFFONSO et al., 2010; GATTI et al., 2010).

Mesmo sendo um teste relativamente simples para execução, interpretação e de permitir a titulação dos soros positivos, a VN tem a desvantagem de ser uma reação que demanda tempo e complexidade laboratorial, pois exige a produção e manutenção de cultivos celulares (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991).

Várias técnicas de ELISA têm sido desenvolvidas para a detecção de anticorpos para o BoHV-1, incluindo o ELISA indireto, de bloqueio, captura e competição. Cada vez mais esses testes proporcionam diferentes possibilidades de diagnóstico tais como: a confirmação de uma infecção aguda através da detecção de Imunoglobulina M (IgM) (FLORENT; WISEMAN, 1990); a diferenciação entre animais infectados e vacinados através da detecção de anticorpos contra a glicoproteína gE, cujo gene é deletado na amostra vacinal (VAN OIRSCHOT et al., 1997); a detecção de anticorpos em amostras de leite (NYLIN; STROGER; RONSHOLT, 1999) e a diferenciação entre anticorpos contra o BoHV-1 e anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) (WELLENBERG et al., 2001).

Uma variedade de técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) têm sido desenvolvidas para detectar o DNA do BoHV-1 em fragmentos de tecidos, secreções nasais e em amostras de sêmen, por ser o isolamento viral, neste caso, dificultado devido à presença de substâncias citotóxicas no líquido seminal (ROCHA et al., 1998; SMITHS et al., 2000; OIE, 2013). Esta técnica também permite a diferenciação entre o BoHV-1 e o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) em virtude do tamanho do produto amplificado, além de ser capaz de separar animais naturalmente infectados com estirpes de campo do BoHV-1 de animais vacinados com estirpes timidino-quinase (MOORE; GUNN; WALLS, 2000).

Pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de estabelecer uma PCR sensível e rápida para a detecção do BoHV-1 em abortamentos, para uso na rotina laboratorial (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Nesses estudos, os autores sempre ressaltam a maior sensibilidade da PCR, quando comparada aos métodos mais tradicionais. Além disso, Mars et al. (1996) relataram que a técnica de PCR também poder ser capaz de detectar o BoHV-1 precocemente, a partir do quarto dia pós-infecção, antes mesmo do aparecimento de anticorpos detectáveis pelos procedimentos sorológicos tradicionais. Mais recentemente, a PCR ganhou um diferencial com o método de diagnóstico *real-time* inovação tecnológica que otimiza os resultados da técnica já existente (CHANDRANAİK, 2010).

A análise por enzima de restrição é uma técnica voltada para a caracterização genômica de estirpes isoladas, sendo, desta forma, dependente da multiplicação do vírus em cultivo celular, para posterior extração e clivagem do DNA viral com enzimas de restrição. Uma vez realizadas as digestões enzimáticas, os produtos obtidos são analisados em gel de agarose a fim de determinar o perfil de restrição do DNA clivado (SILVA et al., 2007; ARRUDA et al., 2010; PESHEV; CRISTOVA, 2010; MEDINA et al., 2010). Este método é bastante usado para determinação dos subtipos virais BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b (ARRUDA et al., 2010).

2.4 Prevalência

O BoHV-1 está presente em rebanhos de praticamente todo o mundo. Em países da Comunidade Europeia, as infecções pelo BoHV-1 apresentam prevalência muito variada. Em alguns países está em processo de erradicação, enquanto outros apresentam prevalências entre 20 e 90%, comprovadamente na França (20%),

Alemanha (30% a 50%), Inglaterra (50%) e Bélgica (60% a 90%). Áustria, Dinamarca, Finlândia, Noruega, Suécia e Suíça são países considerados livres de BoHV-1 (VAN OIRSCHOT, 1998).

Na Tabela 1 estão relacionadas várias referências relativas à prevalência do BoHV-1 em diversos países do mundo.

Tabela 1. Prevalência do BoHV-1 em diversos países, técnica de diagnóstico por vírus neutralização (VN) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) e referência da pesquisa.

Origem	Animal/ tipo de exploração	(%)	Técnica	Referência
Chile	Rebanho bovino	47,2	VN	HOCHESTEIN-MINTZEL et al. (1986)
Holanda	Fêmeas bovinas de diversas propriedades	71,4	VN	FRANKEN (1986)
Grã-Bretanha	Bezerros, acima de 4 meses	34,0	ELISA	HOGG (1992)
Itália	Rebanho bovino	43,3	ELISA	FARAH et al. (1994)
França	Rebanhos bovinos leiteiros	24,5	ELISA	REYNAUD et al. (1995)
Itália	Rebanhos bovinos de gado leiteiro	84,3	VN	CASTRUCCI et al. (1997)
Croácia	Vacas leiteiras	85,8	ELISA	BIUK –RUDAN et al. (1998)
Nova Zelândia	Rebanho bovino	66,5	ELISA	MOTHA; HANSEN (1998)
Escócia	Reprodutores bovinos	49,0	ELISA	MCGOWAN; MURRAY, (1999)
Hungria	Rebanhos bovinos: - pequenos - grandes	15,7 64,1	ELISA	TEKES et al. (1999)
Bélgica	Rebanhos bovinos de gado leiteiro, de gado misto e de gado corte	84,0 89,0 53,0	ELISA	BOELAERT et al. (2000)
Zâmbia	Rebanho bovino	48,3	ELISA	MWEENE et al. (2003)
Venezuela	Rebanho bovino	51,0	ELISA	OBANDO et al. (2004)
EUA	Rebanho bovino	20,4	ELISA	WALDNER (2005)

Cont.

Origem	Animal/ tipo de exploração	(%)	Técnica	Referência
México	Rebanho bovino	41,5	ELISA	CANTU et al. (2008)
Argentina	Rebanho bovino	37,0	ELISA	GUARINO et al. (2008)
Uruguai	Rebanho bovino de corte	69,0	ELISA	GUARINO et al. (2008)
Índia	Rebanho bovino	29,3	ELISA	LATA et al. (2008)
Coréia do Sul	Cabras	9,5	ELISA	YANG et al. (2008)
Turquia	Bovinos com problemas respiratórios	1,7	VN	YESILBAG; GUNGOR (2008)
Índia	Rebanho bovino	41,0	ELISA	BANDYOPADHYAY et al. (2009)
Sudão	Camelos	76,9	ELISA	INTISAR et al. (2009)
Tailândia	Rebanho bovino	18	ELISA	KAMPA et al. (2009)
Bulgária	Rebanho de ovinos	64,0	VN	RUSENOVA; BOCHEY (2009)
Argentina	Rebanho bovino	5,9	ELISA	MARCOPIDO; PARREÑO (2010)
Estônia	Rebanhos bovinos leiteiros	76,5	ELISA	RAAPERI et al. (2010)
Índia	Fêmeas bovinas com problemas reprodutivos	22,2	ELISA	TRANGADIA et. (2010)
Equador	Rebanho bovino	82,1	ELISA	CARBONERO et al. (2011)
Irlanda	Rebanhos bovinos de gado leiteiro e de corte	69,9 79,8	ELISA	COWLEY et al. (2011)
Colômbia	Rebanho bovino leiteiro	17,7	ELISA	QUEVEDO et al. (2011)
Estônia	Rebanhos bovinos leiteiros	49,0	ELISA	RAAPERI et al. (2012)
Irã	Rebanho bovino	61,9	ELISA	ROSHTKHARI (2012)

Já foram realizados inúmeros levantamentos sorológicos no Brasil, que demonstraram que o BoHV-1 também está distribuído nos rebanhos bovinos de corte, de leite e em outras espécies de ruminantes por todo o País.

A prevalência do BoHV-1 em vários estados brasileiros está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Prevalência do BoHV-1 em diversos estados brasileiros, técnica de diagnóstico por virusneutralização (VN) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) ou hemaglutinação passiva (HAP) e referência da pesquisa.

Origem	Animal/tipo de exploração	(%)	Técnica	Referência
Bahia	Rebanho bovino	34,5	VN	GALVÃO; DORIA; ALICE (1963)
Paraná	Rebanho bovino	54,0	ELISA	MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI (1986)
Rio de Janeiro	Rebanho bovino	81,5	HÁP	ANUNCIAÇÃO et al. (1989)
Goiás	Rebanho bovino	85,7	HAP	ANUNCIAÇÃO et al. (1989)
Rio Grande do Sul	Rebanho bovino	81,8	VN	RAVAZOLLO et al. (1989)
Paraná	Rebanho bovino	10,6	VN	KRUGER et al. (1991)
Rio Grande do Sul	Rebanho bovino	18,0	VN	LOVATO et al. (1995)
Pernambuco	Rebanho bovino	69,5	VN	SILVA et al. (1995)
Rio Grande do Sul	Rebanho bovino	29,3	VN	KRAHL et al. (1997)
Paraíba	Rebanho bovino	62,7	VN	MELO et al. (2002)
Sergipe	Rebanho bovino	96,0	VN	MELO et al. (2002)
Goiás	Touros de Centrais de Inseminação	69,4	VN	FARIA et al. (2003)
Goiás	Fêmeas bovinas com problemas reprodutivos	83,0	VN	VIEIRA et al. (2003)
Goiás	Rebanho bovino	51,9	VN	BARBOSA et al. (2005)
São Paulo	Rebanho bovino de corte	36,7	ELISA	JUNQUEIRA (2006)
Minas Gerais	Rebanho bovino	86,0	ELISA	MINEO et al. (2006)
Minas Gerais	Rebanho bovino	54,7	VN	ALEXANDRINO (2008)
São Paulo	Rebanho bovino	54,7	VN	ALEXANDRINO (2008)
Goiás – Região de Goiânia	Rebanho bovino	1,9	VN	AFFONSO et al. (2010)
Região do Centro Goiano	Rebanho bovino	7,6	VN	AFFONSO et al. (2010)
Região do Norte Goiano	Rebanho bovino	17,5	VN	AFFONSO et al. (2010)
Região do Nordeste Goiano	Rebanho bovino	4,5	VN	AFFONSO et al. (2010)
Região Entorno do Distrito Federal	Rebanho bovino	6,2	VN	AFFONSO et al. (2010)
Região do Sudeste Goiano	Rebanho bovino	6,7	VN	AFFONSO et al. (2010)

Cont.

Origem	Animal/tipo de exploração	(%)	Técnica	Referência
Região do sul				
Goiano	Rebanho bovino	9,6	VN	AFFONSO et al. (2010)
Região do Sudoeste Goiano				
Rebanho bovino		17,9	VN	AFFONSO et al. (2010)
Região do Oeste				
Goiano	Rebanho bovino	21,0	VN	AFFONSO et al. (2010)
Região do Noroeste Goiano				
Rebanho bovino		6,7	VN	AFFONSO et al. (2010)
São Paulo - Jaboticabal,				
Rebanho bovino		1,6	VN	GATTI et al. (2010)
Altinópolis e				
Viradouro		40,0		
Maranhão				
Rebanho bovino		78,6	ELISA	BEZERRA et al. (2012)

2.5 Controle e Erradicação do Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)

Programas de combate do BoHV-1 podem ser empregados, utilizando estratégias que incluem ou não a vacinação dos animais, com objetivos de controlar ou até erradicar a enfermidade, levando em consideração a prevalência da doença, os objetivos da propriedade e a região em questão (PITUCO et al., 1997).

Países com prevalências relativamente baixas, como a Dinamarca e a Suíça, implantaram programas de erradicação com excelentes resultados. Além disso, esses países nunca permitiram a vacinação em seus territórios. Outros países que apresentaram apenas poucos casos de BoHV-1 também estão livres, tais como Suécia, Finlândia, Noruega e Áustria (VAN OIRSCHOT, 1998).

O programa de erradicação desenvolvido na Suíça foi dividido em quatro fases: prevenção da transmissão da infecção através da restrição ao comércio de bovinos e conhecimento da prevalência de anticorpos para o BoHV-1 no rebanho; sorologia e abate de animais com anticorpos, a fim de erradicar o BoHV-1 dos rebanhos; detecção e eliminação de novos reservatórios do vírus; programa de monitoramento e ações legais a fim de manter a situação (ACKERMANN et al., 1990).

Países que apresentam soroprevalências altas do BoHV-1 não podem implementar um programa de erradicação baseado em teste e eliminação dos

animais positivos. Esses países, primeiramente, precisam diminuir a incidência das infecções, e isso pode ser conseguido através da vacinação intensiva (VAN OIRSCHOT, 1998).

O controle geralmente é direcionado para diminuir o impacto da doença, enquanto a erradicação tem como finalidade a eliminação total do agente circulante. A erradicação pode ser considerada como alvo definitivo depois do programa de controle da enfermidade (VAN OIRSCHOT, 1998).

Em países com prevalência moderada ou alta da doença, como é o caso do Brasil, o saneamento só é economicamente viável por meio da prevenção de novas infecções, combinada à remoção de animais infectados. Novas infecções não ocorrem se a transmissão viral dentro e entre rebanhos for prevenida. Vacinas marcadas, que permitem a diferenciação sorológica entre anticorpos de animal infectado e de animal vacinado, e o melhoramento nas práticas de manejo do rebanho podem ser valiosos instrumentos em programas de erradicação do BoHV-1 (VAN OIRSCHOT, 1998).

No Brasil, alguns bovinocultores tentam combater voluntariamente a enfermidade, entretanto falta o estabelecimento de diretrizes por parte dos órgãos competentes para a implantação de um programa nacional de controle e erradicação do BoHV-1 (PITUCO et al., 1997).

No Estado de São Paulo, Del Fava et al. (1998) obtiveram sucesso na tentativa de erradicar o BoHV-1 de um rebanho bovino leiteiro de alto valor genético e com baixa prevalência (15,6%) de animais infectados sem a utilização de vacina e realizando uma estratégia que consistia em monitoramento sorológico constante do rebanho, descarte de animais soropositivos, utilização de sêmen livre de BoHV-1 e realização de quarentena quando do ingresso de animais no rebanho.

Portanto, os programas de controle do BoHV-1 devem ser específicos para cada rebanho e devem incluir algumas medidas básicas para evitar a contaminação ou disseminação da infecção dentro do rebanho. De tais medidas destacam-se: utilização de touros não reagentes; sêmen negativo para o BoHV-1; vigilância constante com exame clínico adequado; descarte de fêmeas soropositivas com problemas reprodutivos, tendo em vista que a maioria das propriedades utiliza monta natural; quarentena de animais recém-adquiridos antes da introdução junto ao rebanho a manutenção de programas sanitário e nutricional adequados, que em condições predisponentes de quebra de resistência são de grande valor; e em último

caso, quando se julgar necessário, pode-se fazer a imunoprofilaxia específica dos animais usando vacinação (LAMBERTO, 2003).

2.5.1 Vacinas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

Para imunoprofilaxia artificial ativa contra o BoHV-1 foram desenvolvidos diferentes tipos de imunógenos ou vacinas. Como não existe uma vacina ideal, que proteja 100% dos animais sem efeitos colaterais, os diferentes métodos de produção de vacinas contra o BoHV-1 apresentam vantagens e desvantagens com relação ao tipo e à duração da imunidade, biossegurança, virulência residual, reações adversas, entre outros (VAN OIRSCHOT et al., 1996).

As vacinas contra BoHV-1 podem ser divididas dentro de duas principais categorias: as vacinas com vírus atenuado ou modificado e as vacinas com vírus inativado ou de subunidades. Nestas últimas, é necessário incluir um adjuvante para induzir uma imunidade adequada (VAN OIRSCHOT et al., 1996; LAMBERTO, 2003).

As vacinas com vírus atenuado ou modificado apresentam variações, podendo ser atenuadas por passagens seriadas em cultivo celular, ou modificadas quimicamente, como as vacinas com vírus vivos mutantes termossensíveis. Elas podem ser administradas por via intranasal ou intramuscular, provocando uma rápida resposta imune (dentro de 72 horas), que tem duração relativamente longa. Essas vacinas podem causar imunossupressão, e algumas vacinas administradas por via intramuscular podem causar abortamentos. Os animais vacinados excretam o vírus, constituindo um risco para animais susceptíveis. Além disso, em algumas situações, o vírus vacinal pode tornar-se latentemente infectado (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991; LAMBERTO, 2003).

Segundo Van Oirschot et al. (1996), as vacinas com vírus inativado são administradas por via intramuscular, têm a vantagem de o vírus vacinal não se tornar latente, não causar abortamentos e os animais vacinados não excretarem o vírus, porém não propiciam uma proteção rápida (7 a 10 dias após a segunda dose), podem ter diferentes adjuvantes em suas composições e a duração da imunidade é curta. Silva, Weiblen e Flores (2007) avaliaram em bovinos a imunogenicidade de seis vacinas comerciais inativadas: uma brasileira, uma norte-americana, duas uruguaias e duas argentinas, e verificaram que apenas a vacina norte-americana e uma vacina uruguaia induziram títulos de anticorpos superiores a 16, referência mínima da relação com a proteção.

Outros tipos de vacina denominadas "vacinas marcadas ou geneticamente modificadas" são constituídas por vírus que tiveram a deleção de um ou mais genes não essenciais, ou por subunidades de uma ou mais glicoproteínas. Mutantes de BoHV-1 têm sido desenvolvidos pela deleção de um ou mais genes que codificam as glicoproteínas gC, gG, gI ou gE (VAN OIRSCHOT et al., 1996). Mars et al. (2000b) realizaram experimentos com uma vacina viva gE-deletada e concluíram que a cepa vacinal não é re-excretada após tratamento com corticosteroide e que, conseqüentemente, o vírus vacinal reativado não é disseminado no rebanho. Mars et al. (2001) avaliaram também a eficácia da vacina viva gE-deletada, e os resultados sugeriram que seu uso poderá reduzir a incidência e a transmissão das infecções pelo BoHV-1 a campo.

Uma desvantagem do uso das vacinas convencionais é sua interferência com os diagnósticos sorológicos de rotina e pesquisas soroepidemiológicas. As vacinas marcadas devem ser usadas em conjunto com testes de diagnóstico que detectam anticorpos contra a glicoproteína ausente na cepa vacinal. Desta forma, pode-se diferenciar animais infectados de animais vacinados, o que justifica o outro nome dado a estas vacinas: DIVA - Differentiating Infected from Vaccinated individuals (VAN OIRSCHOT et al., 1996).

Pituco et al. (1997), no Estado de São Paulo, observaram queda relevante na prevalência da infecção em rebanhos que foi utilizada uma hiperimunização (vacinação semestral de animais soropositivos), associada à eliminação gradual dos animais soropositivos, monitoramento sorológico dos negativos, quarentena e utilização de sêmen livre de BoHV-1.

Com relação aos touros de centrais de inseminação artificial, Rocha et al. (1998) concluíram que a vacinação de touros doadores de sêmen deve ser evitada, porém, se adotada, devem ser utilizadas vacinas marcadas, pois permitem a diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados.

2.5.2 Programas de monitoração do BoHV-1 em centrais de colheita de sêmen bovino

A transmissão do BoHV-1 tem sido amplamente favorecida pelo desenvolvimento de processos de criopreservação do sêmen, uma vez que essas técnicas de processamento e armazenamento são ideais para a preservação deste agente (ROCHA et al., 1999).

A presença do BoHV-1 no sêmen implica o risco potencial de disseminação desse agente entre os rebanhos de todo o mundo, implicações essas que não só se centram na infecção exclusiva da fêmea receptora, ou do coletivo da exploração pecuária, como também na possível introdução dessa virose no país importador. Esse risco potencial de transmissão gera uma grande preocupação sobre o intercâmbio nacional e internacional deste material genético e, em especial, sobre os métodos de detecção deste vírus, que é veiculado através do sêmen ou dos embriões, obrigando quase todos os países a implantarem rigorosos programas sanitários voltados para o controle das importações (PHILIPOTT, 1993).

O sêmen contaminado pelo BoHV-1 é um excelente veículo para a difusão desse agente, principalmente pela facilidade de distribuição deste material congelado e pela capacidade do touro para produzir várias doses a partir de uma única ejaculação. Uma vez que a congelação possibilita a sobrevivência desse vírus, a União Europeia e os Estados Unidos da América recomendam um rigoroso controle sanitário sobre os touros mantidos nos centros de colheita de sêmen, exigindo provas de isolamento de agentes infecciosos ou provas sorológicas de todos os animais com idade superior a seis meses. (AFSHAR; EAGLESOME, 1990; PHILIPOTT, 1993).

Países do MERCOSUL estão ainda estudando normas para o comércio de sêmen entre seus integrantes. Assim, o perigo da transmissão de vírus via sêmen segue vigente, como consequência da existência nos centros de I.A. de animais clinicamente sadios ou sorologicamente negativos, porém que estão latentemente infectados pelo BoHV-1. Pela alta prevalência da IBR, ainda existe uma tolerante demanda por sêmen de touros de apreciável valor genético que apresentam sorologia positiva frente a este vírus. Isso obriga a um contínuo monitoramento dos seus ejaculados para a detecção do vírus e, assim, evitar o risco de transmissão por essa via (PHILLIPOTT, 1993).

Tanto que, segundo Afshar e Eaglesome (1990), o vírus da IBR foi detectado em quase todos os centros de colheita de sêmen dos Estados Unidos da América e do Canadá, de onde provêm grande parte do sêmen importado pelo Brasil. Também é importante ressaltar que a infecção causada pelo BoHV-1 está presente em praticamente todos os países sul-americanos, apesar de não ser rotineiramente diagnosticada ou notificada. Nesse sentido, no Brasil estão registrados casos de balanopostites em touros, com eliminação de vírus pelo sêmen, assim como a presença de anticorpos em doadoras e receptoras de embriões.

Os elevados índices de touros sororreagentes ao BoHV-1 em centrais de colheita de sêmen no Brasil demonstram que os rebanhos de cria e recria estão recebendo material genético de reprodutores infectados (PITUCO et al., 1997). A pesquisa de vírus em sêmen congelado, proveniente de touros mantidos em centrais de colheita de sêmen no Brasil, tem diagnosticado partidas infectadas (MEYER et al. 2001), motivo pelo qual se recomenda a pesquisa de vírus em todas as partidas provenientes de touros sororreagentes e descarte das infectadas (MEYER et al. 2001; OIE, 2013).

Vale ressaltar que em centrais de colheita de sêmen da Europa exigem que os touros sejam soronegativos para o BoHV-1. Por outro lado, a OIE (2013) prevê que países importadores devem exigir certificação do sêmen industrializado como livre de BoHV-1. Já o sêmen congelado deve ser adquirido de touro não reagente ou de partidas com certificação livre de BoHV-1 (TIKOO; CAMPOS; BABIUK, 1995).

As condutas sanitárias para a IBR/IPV são periodicamente revistas pela OIE, e pelo fato de o Brasil ser membro dessa organização, deve acompanhar as mudanças para poder realizar a certificação sanitária dos produtos pecuários, atendendo assim às exigências do mercado internacional. O Brasil possui rebanhos bovinos geneticamente melhorados. A conscientização de que sanidade e produtividade devem caminhar juntas pode e deve sempre ser reforçada, para vislumbrar um futuro melhor, pois uma das grandes fatias de arrecadação de divisas é a venda e exportação de reprodutores, sêmen e embriões. As exigências de certificação de produtos tem se intensificado com a ampliação das fronteiras mercadológicas advindas da globalização. Cabe aos técnicos entenderem o momento e aplicarem metodologias de diagnóstico e prevenção para poder obter os resultados almejados (BARBOSA et al., 2005).

O êxito dos programas de controle de infecção do BoHV-1 no sêmen depende, em boa parte, da identificação e eliminação de animais infectados ou portadores. Usualmente nesses animais o controle é feito por meio do isolamento de vírus em cultivos celulares, inoculação em animais suscetíveis ou, então, pela detecção indireta usando técnicas sorológicas, como VN, IF, ELISA entre outras (ALFIERI, 2000).

A maioria dessas técnicas, entretanto, apresenta limitações, principalmente de ordem prática, resultantes da sua complexidade, da infraestrutura necessária à sua realização, ou da lentidão dos procedimentos laboratoriais necessários para a detecção e caracterização de fatores relacionados com os agentes patogênicos. Por

outro lado, existem também limitações quanto às características de sensibilidade e especificidade. Por esses motivos, nos últimos anos têm-se intensificado a busca por técnicas de maior rapidez, precisão e confiança, que possibilitem o diagnóstico do BoHV-1 com um grau de sensibilidade e especificidade similar ou superior aos procedimentos convencionais, e cujos resultados sejam obtidos no mesmo dia. Desta maneira, técnicas simples e de fácil execução para a caracterização de proteínas e ácidos nucleicos, como as imunoenzimáticas e immunoblotting, ou as amplificações "in vitro" de ácidos nucleicos por meio da PCR, são recomendadas para substituir os métodos convencionais de diagnóstico desse vírus (RODRIGUEZ; SCHUDEL, 1993).

2.6 Avaliação das características seminais

Além de monitorar a presença do BoHV-1 e de outros agentes infecciosos, as centrais de colheita de sêmen submetem as amostras colhidas a diversos testes de avaliação de qualidade espermática.

A avaliação espermática tem como objetivo estimar o potencial de fertilidade de um indivíduo, determinar, entre vários indivíduos, aqueles com maior fertilidade, e estabelecer características confiáveis que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade (FRENEAU, 2011).

Atualmente os métodos de avaliação utilizados em centrais de colheita de sêmen de bovinos consistem basicamente em análise subjetiva da motilidade, vigor (antes e após estresse térmico), concentração, volume e morfologia espermática. Porém pode-se estimar, mas não assegurar, a fertilidade do sêmen com base nessas avaliações, uma vez que não é avaliada a capacidade do espermatozoide de sofrer alguns processos *in vivo*, tais como a capacitação e a reação acrossômica, necessários para a fecundação (MAZZIERO et al., 2009)

Sendo assim, o desenvolvimento de ensaios laboratoriais para predizer a capacidade fecundante do sêmen tem instigado há muitos anos os pesquisadores. Entretanto, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen (ARRUDA et al., 2005). Por essa razão, têm ocorrido grandes avanços no estudo da célula espermática, permitindo o desenvolvimento de muitas técnicas para avaliar outros aspectos do espermatozoide, tais como: integridade de membrana plasmática, acrossomal e capacitação. A análise desses parâmetros fornece importantes informações sobre a amostra de sêmen (CELEGHINI et al., 2008).

Para a realização dessas análises, é de fundamental importância que as colheitas das amostras de sêmen sejam realizadas com um rigoroso padrão de qualidade. Embora existam diversos métodos para colheita de amostras de sêmen, a eletroejaculação é o mais popular e o mais indicado para a colheita em touros de campo que não foram condicionados a outros procedimentos. Para a análise e a interpretação do espermiograma, há valores de referência para os diferentes atributos (motilidade, concentração, etc.). Esses valores de referência são determinados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) e estão disponíveis na publicação “Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal” (CBRA, 1998)

2.6.1 Avaliação de características físicas do sêmen

No exame físico do sêmen, entre outras análises, são realizadas avaliações de volume, motilidade, vigor e concentração espermática. O volume do ejaculado deve ser lido diretamente no tubo de colheita e expresso em mililitros. Esse valor é relativo e depende do método de colheita e do regime sexual anterior à colheita, e não existe valor mínimo ou valor máximo estabelecido (BARBOSA et al., 1991). A motilidade é a avaliação subjetiva do percentual de espermatozoides móveis. O exame é realizado em microscópio de contraste de fase com 100x de aumento, observando-se uma gota de sêmen fresco, entre lâminula e lâmina previamente aquecida a 37°C. A motilidade é dada em porcentagem e significa o número de espermatozoides com motilidade progressiva em cada 100 deles observados (FRENEAU, 2011). O vigor é a intensidade de movimentação do espermatozoide observado individualmente. A avaliação deve ser feita na mesma preparação para motilidade e logo após essa avaliação. A escala de avaliação varia de zero a cinco, em que zero representa células paradas e cinco, movimento vigoroso e de alta velocidade (ANCHIETA et al., 2005).

A concentração espermática representa o número de espermatozoides por unidade de volume ejaculado. Existem vários métodos para contagem, o mais utilizado é a contagem em câmara de Neubauer, em que um volume de sêmen conhecido é diluído em um volume também conhecido de meio (geralmente formolsalina tamponada), que, após homogeneização, é colocado na câmara e a determinação é realizada em microscópio óptico com objetiva de 10 ou 20 vezes de aumento, sendo o resultado expresso em número de espermatozoides/mL de

sêmen. A concentração varia em função de fatores extrínsecos (método e frequência de coleta) e intrínsecos (idade, biometria testicular) (BARBOSA et al., 1991).

2.6.2 Avaliação da morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática no exame andrológico de rotina de touros é considerada o aspecto isolado que mais se relaciona com a fertilidade no rebanho. Também adquire importância para caracterizar, de forma prática, a idade da maturidade sexual de um touro. Após vários estudos, Blom (1973) adotou a classificação em defeitos maiores e defeitos menores, segundo a origem do defeito.

Os defeitos maiores são anomalias no acrossomo, gota citoplasmática proximal, cabeça subdesenvolvida, estreita na base, pequena anormal, contorno anormal, "pouch formation", diadema, cauda enrolada na cabeça, piriforme, formas teratológicas, patologias da peça intermediária, cauda fortemente dobrada ou enrolada na cabeça, cauda dobrada com gota e formas duplas. Os defeitos menores são cauda levemente dobrada ou enrolada, retroabaxial, oblíqua, gota citoplasmática distal e cabeça, podendo ser delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal (BLOM, 1973).

Para a análise da patologia dos espermatozoides, ou seja, das alterações nas características morfológicas, há a necessidade de um microscópio com o dispositivo de contraste de fase. É preciso utilizar esfregaços em lâmina, corados para exame em microscopia óptica, sob imersão, com aumento de 1.000 vezes, associado ao exame em preparação úmida. Para este último, deve ser montada a lâmina com uma pequena gota do sêmen da amostra armazenada em solução formolsalina, colocada entre lâmina e lamínula, lacrada com esmalte e observada em microscopia de contraste de fase (aumento de 1.000 x). Em cada preparação devem ser analisadas pelo menos 200 células, e os resultados da frequência das alterações são expressos em porcentagem (BLOM, 1973).

Na interpretação da morfologia espermática, devem ser considerados, para defeitos maiores, os limites de 5% para os individuais e 20% para os totais, e para os defeitos menores, 10% para individuais e 25% para os totais. Para o total de defeitos, ou seja, a soma de defeitos maiores e de defeitos menores, o limite é de 30% (BLOM, 1973).

2.6.3 Avaliação de integridade de membrana plasmática, acrossomal e capacitação

Os espermatozoides são constituídos por vários compartimentos na membrana plasmática, e a manutenção da integridade e funcionalidade dessa membrana é de fundamental importância, visto que uma membrana intacta e funcionalmente ativa é requerida para o metabolismo espermático, a capacitação, a reação do acrossoma, a ligação e a penetração no ovócito. Sendo assim, a avaliação da funcionalidade das membranas parece ser um importante parâmetro para avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides (FREITAS-DELL' AQUA, 2009).

Graham e Mocé (2005) definem integridade de membrana plasmática como sinônimo de viabilidade espermática. Muitos estudos fundamentam-se na ideia de que a membrana plasmática intacta impede certos corantes de penetrarem na célula espermática.

Mais recentemente, foi desenvolvido e testado o uso de sondas fluorescentes para DNA, enzimas intracitoplasmáticas, lecitinas ou mesmo de potencial de membrana, o que tem provido novas ferramentas para avaliar a funcionalidade do espermatozoide pós-descongelamento. Os estudos iniciais para avaliação da integridade de membrana em espermatozoides com o uso de sondas fluorescentes citam o brometo de etídeo, o qual penetra apenas em células com lesão de membrana, com especificidade por DNA, e quando intercalado à dupla hélice, sua fluorescência aumenta; no entanto, devido à sua grande toxicidade, o uso desse fluorocromo tem sido restringido (FREITAS-DELL' AQUA et al. 2009).

Dentre os diversos corantes fluorescentes utilizados nas análises de integridade de membrana pode ser destacado o Hoechst 33342, Hoechst 33258 (MAZZIERO et al., 2009) e Iodeto de Propídeo (IP) (CELEGHINI et al., 2008). Dentre estes, o IP vem sendo mais amplamente utilizado devido à facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana plasmática. O IP é um fluorocromo de alta intensidade ao qual a membrana plasmática íntegra é impermeável. Dessa forma, ele se liga somente ao DNA de espermatozoides cuja membrana está danificada, corando o núcleo de vermelho (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999).

Atualmente, a associação de sondas fluorescentes vem sendo utilizada, tais como o uso simultâneo de IP e Hoechst 33342 ou SYBER-14 (CARVALHO, 2009).

Outra sonda que vem sendo amplamente utilizada juntamente com o IP para avaliação de integridade de membrana plasmática é o Diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA), fluorocromo que penetra rapidamente na membrana plasmática intacta, ainda na forma não fluorescente. No entanto, no interior da célula, o C-FDA é hidrolisado por esterases, resultando em 6-carboxifluoresceína livre, altamente fluorescente, sendo retido no interior da célula com membrana plasmática íntegra, fluorescendo de verde (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999).

Para avaliação da condição acrossomal, assim como para integridade da membrana plasmática, um grande número de técnicas podem ser utilizadas, entretanto a técnica que utiliza lecitinas conjugadas destaca-se pela praticidade e eficácia nos resultados obtidos (SILVA; GADELLA, 2006) . As lecitinas conjugadas se ligam a glucose, mannose, galactose e N-acetilglucosamina ou outros carboidratos específicos de glicoproteínas que estão exclusivamente localizados no acrossoma. Dependendo da espécie de mamífero, as lecitinas mais comumente utilizadas são *Psium sativum* PSA ou PNA (SILVA; GADELLA, 2006; CARVALHO, 2009). Para visualização em microscopia de epifluorescência, estas aglutininas devem ser conjugadas ao FITC (CELEGHINI et al., 2008) e ao IP (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999). As lecitinas são impermeáveis ao acrossoma intacto, no entanto a reação acrossomal ou acrossoma danificado permite a entrada dessas macromoléculas. O PNA se liga a glicoproteínas da membrana acrossomal externa, e o PSA se liga a componentes enzimáticos da matriz na luz do acrossoma, ou seja o açúcar α -manosidade, encontrado no conteúdo acrossomal (CELEGHINI et al., 2008; SILVA; GADELLA, 2006). Para células não fixadas, a presença de coloração verde na região do acrossoma indica acrossoma reagido (CELEGHINI et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar parâmetros clínicos, alterações sorológicas e qualidade do sêmen de touros jovens infectados experimentalmente com BoHV-1, em comparação com touros não infectados.

3.2 Objetivos específicos

Descrever a evolução da infecção com BoHV-1, observando o curso dos sinais clínicos e a temperatura retal no grupo de touros do experimento.

Quantificar os níveis de anticorpos contra o BoHV-1, por meio da técnica de VN, com o intuito de monitorar a resposta imune humoral de touros do experimento.

Identificar material genético do vírus ao longo do tempo por meio da técnica de PCR no sêmen dos touros do grupo controle e inoculados experimentalmente com o BoHV-1.

Avaliar a qualidade espermática dos touros do grupo controle e inoculados experimentalmente com o BoHV-1.

Realizar avaliações histopatológicas em fragmentos de testículos e epidídimos dos animais do experimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização dos Animais do Experimento

Este experimento foi autorizado em reunião ordinária de 7 de julho de 2011 da CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal, com protocolo de número 0143030/11.

Para a realização do experimento foram utilizados 12 bovinos machos não castrados, com aproximadamente 30 meses de idade, mestiços, Girolandos, criados com o mesmo manejo, porém em locais diferentes da mesma propriedade (Fazenda Palmital) do Instituto Federal Goiano, Câmpus Urutaí - Goiás. Antes de iniciar o experimento, um lote de 50 touros, com idade e caracterização racial definidas anteriormente, foi submetido a dois testes de qualidade espermática, o que possibilitou selecionar para a pesquisa apenas os animais que apresentaram no exame as seguintes características: concentração espermática $\geq 400 \times 10^6$ (FRENEAU, 2011) e motilidade espermática $\geq 70\%$, vigor espermático ≥ 3 em uma escala de 0 a 5 (CBRA, 1998) e acima de 70% de células espermáticas normais de acordo com os parâmetros de (BLOM, 1973).

Trinta e quatro touros que atendiam esses requisitos foram testados pela técnica de VN, só depois escolhidos 23 que foram negativos nos testes do BoHV-1. Após os resultados da reação de VN, foram separados do lote 12 touros que apresentavam os resultados mais próximos em relação às características espermáticas avaliadas. A partir daí os touros foram separados em dois grupos, com seis animais cada, mantidos em locais diferentes. Um grupo foi inoculado experimentalmente com o BoHV-1, e o outro ficou como grupo controle.

O projeto em questão foi realizado em quatro centros de pesquisa: Laboratório de Viroses da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP de Jaboticabal, Laboratório de Tecnologia de sêmen da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Cerrados, Planaltina- DF, Laboratório de Microscopia de Epifluorescência da Universidade de Brasília (UnB), Brasília- DF, e no Instituto Federal Goiano, Câmpus Urutaí.

4.2 Amostragem

Foram feitas oito colheitas de sangue e sêmen em cada grupo de touros controle e inoculados com intervalos semanais, sendo que a primeira feita antes no dia 0 e as demais nos dias 0, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 após a inoculação experimental. Ao todo foram colhidas 96 amostras de sangue e 96 de sêmen em ambos os grupos, durante todo o experimento.

4.3 Inoculação Viral

Para a infecção experimental foi utilizada a amostra padrão Nebraska do BoHV-1 inoculada pelas vias intranasal e intraprepucial com 10 mL de suspensão viral (dose total de $10^{7,0}$ TCID₅₀/mL) repartida em ambas as vias.

4.4 Avaliação clínica dos touros inoculados

Após a inoculação os touros foram monitorados por meio de parâmetros determinados diariamente pela aferição da temperatura retal durante 14 dias no período da manhã e presença de sinais clínicos, tais como: secreções nasais, dispneia, lesões ulcerativas, hiperemia, edema, presença de pontos hemorrágicos ou pequenas pústulas no prepúcio e problemas com a micção, por até 18 dias.

4.5 Colheita de Sangue

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular ou veia sacral média, utilizando-se tubos sem anticoagulante com sistema a vácuo (Vacunteiner Becton-Dickson®).

Foi realizada uma colheita prévia de sangue para certificação da negatividade dos touros frente ao BoHV-1 antes da inoculação. A cada semana depois da infecção experimental foram colhidas mais sete amostras de cada animal. No momento da colheita as amostras foram deixadas em repouso em temperatura ambiente para retração do coágulo e, em seguida, foram transportadas sob refrigeração para o laboratório onde foram centrifugadas a 744 x G durante 10 minutos, para separação do coágulo. Os soros obtidos foram estocados à temperatura de -20 °C até o momento da realização dos testes.

4.6 Procedimentos de Análise Sorológica

Os procedimentos relacionados à manutenção das culturas celulares até terminar com a VN seguem as recomendações preconizadas pelo “Manual de Testes Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, Organização Mundial de Saúde Animal” (OIE, 2013).

4.6.1 Manutenção das culturas celulares

Para o desenvolvimento da reação de VN, foram utilizadas células MDBK, mantidas em monocamada em garrafas de poliestireno (TPP®), com área de 75cm². As células foram cultivadas em “Minimum Essential Medium” (MEM) (Gibco®), filtrado em filtro (Millipore®) de 0,22 µm, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio, tamponado em pH 7 e enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®).

Subculturas, ou seja, passagens sucessivas de células com a finalidade de manutenção da viabilidade celular, foram produzidas a cada 48 horas. Nessa ocasião, foi retirado o meio de cultivo das garrafas que apresentavam uma monocamada celular completa, as células foram lavadas duas vezes com tripsina-versene (Difco®), em seguida a monocamada foi novamente submetida ao tratamento com solução de tripsina-versene (Difco®), por um período de 2 a 3 minutos em estufa a 37°C, para promover o desprendimento do tapete celular e a individualização das células. Após essa individualização, a solução de tripsina-versene foi desprezada, e a ressuspensão celular feita pela adição do meio de manutenção MEM contendo 10% de SFB.

Posteriormente uma alíquota dessa suspensão foi retirada para contagem em câmaras de Neubauer para determinação da concentração celular. Feitos os cálculos, preparou-se a suspensão com 3,0x10⁵ células/mL para adição nas placas de reações de VN, e com 200.000 células/mL para outros subcultivos de células em garrafas de 75 cm². A seguir, as garrafas foram colocadas em estufa à temperatura de 37°C para formação de novo tapete celular para utilização posterior.

4.6.2 Multiplicação viral

A suspensão viral padrão utilizada nas reações de VN foi obtida inoculando 1 mL de amostra preparada do vírus BoHV-1 estirpe Nebraska, em garrafa contendo

monocamada de células MDBK pré-formada. O cultivo celular inoculado foi incubado em estufa, à temperatura de 37°C, por 1 hora para adsorção do vírus nas células. Transcorrido esse tempo, foram adicionados 5 mL do meio de manutenção. Novamente a garrafa foi submetida a incubação em estufa à temperatura de 37°C até que o tapete celular apresentasse aproximadamente 90% de efeito citopático (EC).

Assim que a monocamada apresentou o EC desejável, o inóculo foi submetido ao congelamento à temperatura de -80°C, seguido de rápido descongelamento em banho-maria à temperatura de 37°C, para rompimento das células e conseqüentemente liberação de maior quantidade de partículas virais. Em seguida, o inóculo foi clarificado por centrifugação a 1.800 x G à temperatura de 4°C por um período de 15 minutos. Finalmente o sobrenadante contendo as partículas virais foi distribuído em criotubos, no volume de 0,7 mL, depois vedados e armazenados em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C. Uma dessas alíquotas foi descongelada e submetida ao processo de titulação viral.

4.6.3 Titulação viral

Para determinação do título do vírus, foram utilizadas placas de microtitulação descartáveis de poliestireno cristal, com 96 cavidades de fundo chato (TPP®). Em cada poço acrescentaram-se 50 µL de meio MEM (pH 7), exceto na nona coluna, que permanecia vazia para separar as cavidades com diluições virais daquelas com os controles celulares. Em seguida, a alíquota de vírus descongelada foi diluída, em tubos de ensaio, em escala logarítmica seriada de base 10 (10^{-1} a 10^{-8}), mantendo sempre os tubos em banho de gelo, para evitar a queda do título viral. Em cada uma das oito primeiras colunas da placa de microtitulação foi colocada a respectiva diluição (a primeira coluna recebeu a diluição 10^{-1} e assim por diante, até que a oitava coluna recebeu a diluição 10^{-8}) (REED; MUENCH, 1938).

Depois foram acrescentados, em cada poço da placa, 50 µL de suspensão de células MDBK na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL. As colunas de número 10, 11 e 12 foram os controles celulares e receberam apenas 100 µL de meio e a suspensão celular na mesma quantidade e concentração do restante da placa. Terminado esse procedimento, a placa foi incubada em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂. Decorridas 96 horas, a placa foi observada em microscópio invertido, para pesquisar os efeitos citopáticos

característicos de cada vírus. O título viral foi calculado segundo o método de REED; MUENCH (1938).

4.6.4 Pesquisa de anticorpos neutralizantes

A pesquisa de anticorpos neutralizantes foi realizada pelo teste de VN, descrito no “Manual de Testes Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, OIE, 2013” usando a estirpe Nebraska do BoHV-1 proveniente da Universidade Estadual de Londrina - PR.

Os soros a serem testados foram descongelados, inativado o sistema complemento em banho-maria à temperatura a 56°C durante 30 minutos, e colocados em duplicata nas microplacas de 96 cavidades. Na primeira coluna de cada placa, foram adicionados 100 µL de meio MEM em cada cavidade, e nas demais, 50 µL, excetuando a da coluna 3, onde a diluição foi de 1:2. Em seguida, foram adicionados 50 µL da amostra na segunda, terceira e quarta colunas. Como próxima etapa foi feita a diluição seriada, a partir da quarta coluna, que tinha a diluição 1:4, até a décima segunda coluna, onde a diluição foi de 1:1024.

Após esse processo, em cada cavidade, exceto na primeira e segunda coluna, que foram controles, foram adicionados 50 µL da suspensão viral ajustada a uma concentração de 200 TCID₅₀. Para o preparo das 200 TCID₅₀, foi subtraído o logaritmo de 200 TCID₅₀ (2,3) do título viral. Do resultado da subtração foi obtido o antilogaritmo correspondente. Este valor representava o volume final da diluição que continha as 200 TCID₅₀. Após a adição dessa suspensão viral, as microplacas foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ por um período de 18 a 24 horas.

Após a incubação da mistura soro com vírus e meio de cultura, foram adicionados em cada cavidade da placa 100 uL de uma suspensão de células MDBK, numa concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL, cultivadas em MEM suplementado com 10% de SFB. Terminada essa etapa, a microplaca foi novamente incubada à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ por um período de 72 horas, seguida de leitura do efeito citopático característico. Foram utilizados em cada prova o controle do soro e o controle de células MDBK. A interpretação do teste considerou positiva a amostra de soro que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2.

Amostras pareadas de cada animal foram testadas na mesma microplaca, e o título expresso como o inverso da diluição capaz de neutralizar as 200 TCID₅₀.

Nas reações de VN foi também verificado se as TCID₅₀ do BoHV-1 estavam dentro do intervalo de validação do teste preconizado pelo “Manual de Testes Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, Organização Mundial de Saúde Animal”, que é de 20 a 200 TCID₅₀. Foi utilizada a mesma diluição que definiu as 200 TCID₅₀ na placa de validação da reação, a partir da qual foram obtidas as diluições que definiram 0,2 TCID₅₀, 2,0 TCID₅₀ e 20 TCID₅₀ para o BoHV-1.

Com as diluições preparadas, utilizando uma placa de microtitulação com 96 cavidades, foram colocadas nas quatro primeiras colunas as respectivas diluições contendo 0,2 TCID₅₀, 2,0 TCID₅₀, 20 TCID₅₀ e 200 TCID₅₀, sendo a quinta e a décima primeira coluna mantidas como colunas limítrofes, onde nenhum reagente foi adicionado. As cavidades da última coluna desta placa foram destinadas ao controle da suspensão celular.

Em cada reação também foram realizados os mesmos procedimentos de titulação descritos no item 4.5.3, pois a suspensão viral foi obtida a partir de uma das diluições (10^{-1} a 10^{-8}), e o título viral estabelecido foi confirmado utilizando as cavidades das cinco colunas que ainda restavam na placa. Como o valor desse título já era previamente conhecido, e por questões de espaço na placa, foram utilizadas apenas as diluições com intervalos próximos ao título. Sendo assim, foram adicionados 50 µL de cada diluição por cavidade nas colunas correspondentes às diluições desejadas, com oito repetições

Transcorrido o período de incubação de 24 horas, pois esta placa foi submetida ao mesmo intervalo de tempo da reação de VN, foram adicionados, em todas as cavidades da placa, 50 µL da suspensão viral de células contendo $3,0 \times 10^5$ céls./mL em meio de manutenção MEM acrescido de 10% de SFB. A placa de validação foi mantida em estufa a 37°C com atmosfera controlada contendo 5% de tensão de CO₂. A leitura foi realizada antes das demais placas da reação de VN, pois os resultados nela encontrados validavam ou não o teste realizado.

4.7 Procedimentos de Análise de Sêmen

Todos os procedimentos de análises a fresco, cálculo da concentração e descongelação das amostras de sêmen foram feitos segundo o protocolo

recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal e estão disponíveis na publicação “Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal” (CBRA, 1998).

4.7.1 Colheita de amostras de sêmen

As amostras de sêmen foram colhidas antes e durante sete semanas após os animais serem infectados experimentalmente com o BoHV-1, datas seguidas também para o grupo controle. Durante todo o experimento, os grupos de animais infectados e controle permaneceram em locais distintos na Fazenda Palmital do Instituto Federal Goiano Campus-Urutaí.

Antes do início do experimento, os animais foram condicionados à colheita de sêmen por meio de eletroejaculação.

Todas as colheitas realizadas seguiram o mesmo protocolo:

- contenção do animal em tronco coberto e com brete;
- poda dos pelos do prepúcio, permanecendo com cerca de 1cm de comprimento;
- massagem da uretra, estimulando o animal a urinar;
- lavagem do prepúcio com solução de Kíolol 0,4%;
- preparação de um suporte com funil adaptado a um tubo, para colheita do ejaculado;
- preparação do eletroejaculador previamente carregado;
- limpeza do reto do animal;
- aproximação do coletor junto ao prepúcio;
- introdução do eletroejaculador no reto, com a região da probe que possui metal voltada para baixo.;

Após a introdução do eletroejaculador no reto, iniciou-se a aplicação de voltagens gradativas, com períodos de estimulação rítmica repetida, alternando com períodos de descanso. Os intervalos dos estímulos, no início, para o animal expor o pênis, foram de 2 a 3 segundos de duração e meio segundo de descanso, de 5 a 10 estimulações com intensidade de 0 a 250 A. Quando o animal começou a liberar o pré-ejaculado aplicaram-se estímulos mais intensos e de maior duração, 5

segundos, com o mesmo período de descanso e cerca de 15 a 20 estimulações com intensidades que variaram de 250 a 500 A. No eletroejaculado, em geral, é eliminado primeiramente o plasma seminal ou pré-ejaculado, que é menos denso. O ejaculado posterior é que foi aproveitado (SILVA; DODE, 1993).

4.7.2 Testes no sêmen fresco

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi levado ao laboratório e foi mantido em banho-maria à temperatura de 37°C até o processamento final. A motilidade e o vigor dos espermatozoides foram analisados sobre lâmina aquecida à temperatura de 37°C, em microscópio de contraste de fase com aumento de 100 x vezes. O resultado da motilidade foi dado em valores de 0% a 100%. O vigor foi avaliado em uma escala de 0 a 5, classificando desta forma a diferença de intensidade de movimento dos espermatozoides. O volume foi averiguado pela leitura direta do tubo de colheita graduado com fração de 0,1 mL (CBRA, 1998).

Concomitantemente a essas análises, separou-se uma alíquota de sêmen fresco em *ependorf* contendo 1 mL de solução de formol-salina tamponada, material que posteriormente foi utilizado para a análise da morfologia espermática (CBRA, 1998)

Após a motilidade, o vigor e o volume terem sido averiguados, o ejaculado foi diluído com o meio de congelamento Botu-Bov (Botupharma-Ltda/ME) na proporção de 1:1 e mantido à temperatura de 37°C até o término do cálculo da concentração e consequentemente o volume final do diluente ter sido definido.

4.7.3 Cálculo da concentração espermática

Primeiramente foi preparada uma mistura com 5 µL de sêmen e 995 µL de água, da qual foram colocados 10 µL em cada lado de uma câmara de Neubauer. Posteriormente foi feita a contagem de cinco quadrantes de cada lado da câmara em microscopia óptica com aumento de 400 x. A diferença da soma entre os dois lados da câmara só tinha validade quando não ultrapassava 10%. A soma dos dois quadrantes da câmara então era dividida por 2, e o valor obtido multiplicado por 10^7 , resultando na quantidade de espermatozoides por mL (concentração a fresco) (CBRA, 1998).

4.7.4 Envase do sêmen

O envase das palhetas foi realizado com seringa de 0,50 mL. Foram utilizadas palhetas da marca MINITUB, fabricadas em cloreto de polivinil, medindo 133 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro

Todas as palhetas foram seladas com álcool polivinílico, verificou-se antes a identificação de todos os dados nas palhetas, referente ao número do touro e à da respectiva colheita.

Após o envase, as palhetas foram submetidas à curva de congelação, sendo colocadas na geladeira a uma temperatura de 4°C, onde permaneceram por um período de 4 horas. Em seguida, foram dispostas horizontalmente sobre o vapor de nitrogênio líquido por 15 minutos, a uma temperatura de -150°C, só então foi efetuada a congelação, a colocação em raques, e o armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C, até o momento de análise (SENGER, 1986).

4.7.5 Descongelamento das amostras

Para examinar o sêmen, as palhetas foram descongeladas em água à temperatura de 35°C a 37°C durante 30 segundos. Em seguida, foram cortadas, e o conteúdo depositado em um *eppendorf*, para melhor homogeneização da amostra.

O tubo contendo o sêmen foi deixado em banho-maria à temperatura de 37°C para a realização de todas as avaliações programadas (CBRA, 1998).

4.7.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

Para a realização da técnica de PCR, foi utilizado o Kit da Prômega, cujo protocolo e metodologia para diagnóstico do BoHV-1 em amostras de sêmen já estão bem estabelecidos.

No início da extração do DNA, de acordo com as recomendações do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Prômega), utilizou-se 150 µL de amostra de sêmen, que foi centrifugada a 1.000 X G por um período de 10 segundos, originando um pellet que posteriormente foi lavado com PBS e vortexado. Em seguida foram adicionados a esse material 600 µL de solução de lise de ácido nucleico, que foi misturado com a utilização de pipeta.

Para a lise e precipitação das proteínas, utilizou-se 3 µL de RNase ao material misturado, incubou-se a 37°C por 30 minutos, após isso foram adicionados 200 µL da solução de precipitação da proteína. O produto dessa mistura passou pelo vortex, foi colocado em banho de gelo durante 5 minutos e posteriormente foi centrifugado a 1.000 x G por 4 minutos.

A precipitação e a reidratação do DNA iniciaram-se com a transferência do sobrenadante da centrifugação anterior para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol à temperatura ambiente. Após esse procedimento o material foi misturado por inversão, centrifugado a 1.000 x G por um minuto, removido o sobrenadante e adicionados 600 µL de etanol também à temperatura ambiente. Posteriormente esse material foi centrifugado a 1.000 X G por 2 minutos, o etanol foi aspirado e o pellet originado foi secado por 15 minutos e reidratado com 100 µL de solução de reidratação. O extrato de DNA foi armazenado à temperatura de - 20°C e utilizado posteriormente.

Após a extração, o DNA e os primers foram adicionados ao mastermix, solução que contém Taq polimerase, desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTPs) e cloreto de magnésio (MgCl₂). A essa mistura foi adicionada água para completar a reação. O tampão do mastermix sendo verde possibilitou a sua aplicação direta no gel de agarose após a retirada do termociclador. A reação enzimática ocorreu a partir de primers de PF 5-CTAACATGGAGCGCCGCTT-3 e PR 50-CGGGGCGATGCCGTC-30. A amplificação utilizou um termociclador Techne (UK): na temperatura de 94,8°C durante 5 min (1ciclo), seguido por 35 ciclos de 1 minuto à temperatura de 94,8°C, 1 minuto à temperatura de 61,8°C, e 1 minuto à temperatura de 72,8°C e para a extensão final um tempo de 5 minutos à temperatura de 72,8°C.

Os produtos de amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0%. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita por meio da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL).

4.7.7 Avaliação da morfologia espermática

Para a análise da morfologia dos espermatozoides, foram utilizadas as amostras mantidas em solução formol-salina tamponada, no momento das colheitas. Para a realização deste teste, foi colocada uma gota de sêmen da amostra entre

lâmina e lamínula e observada em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1.000 x (CBRA, 1998).

Foram feitas duas preparações e em cada uma foram examinadas pelo menos 100 células, perfazendo um total de 200 células analisadas para cada amostra. Os resultados de frequências das alterações encontradas foram expressos em porcentagem, detectando a quantidade de espermatozoides normais e a ocorrência de possíveis defeitos espermáticos. Posteriormente, os defeitos foram classificados, de acordo com Blom (1973), em maiores, menores e totais.

4.7.8 Análise de integridade de membrana plasmática e acrossoma

As análises de membrana plasmática e acrossoma foram realizadas no laboratório de microscopia de epifluorescência da Universidade de Brasília (UnB).

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando o C-FDA e IP (Molecular Probe®, Eugene, Oregon, EUA). Conforme descrito por Martins et al. (2007), uma amostra de 10µL de sêmen descongelado foi adicionada a 40µL de solução corante e incubada por 10 minutos em microtubo protegido da luz. Uma alíquota de 10 µL da mistura foi colocada em uma lâmina coberta com uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 395/420 nm excitação/emissão). Foram examinadas 200 células espermáticas por lâmina, sendo classificadas as porcentagens de: membrana íntegra (presença de coloração verde na cabeça); membrana lesada (presença de coloração vermelha na cabeça) (SILVA; GADELLA, 2006).

A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando uma conjugação de FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim PNA e IP. como descrito por Celeghini et al. (2008), uma amostra de sêmen de 10 µL foi diluída em 30 µL de uma solução de corante e incubada por 10 minutos. Uma alíquota de 10 µL de solução de corante com sêmen foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. Foram examinadas 200 células espermáticas em microscópio de contraste de fase e microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão).

Os espermatozoides foram classificados em quatro categorias, sendo: porcentagem de morto com acrossoma íntegro (presença de coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma); porcentagem de morto com

acrossoma reagido (presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma); porcentagem de vivo com acrossoma íntegro (ausência de coloração na cabeça e no acrossoma); porcentagem de vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma) (CELEGHINI et al., 2008).

4.8 Exame anátomo-histopatológico dos testículos e epidídimos

Setenta dias após a infecção experimental com BoHV-1, os bovinos pertencentes a cada grupo foram orquiectomizados pelo método cirúrgico, posteriormente à avaliação macroscópica os testículos foram seccionados na porção média, enquanto os epidídimos foram seccionados na região do corpo, a seguir estes foram fixados em formol por 24 horas. Em seguida, foram conservados em álcool etílico a 70%. Após fixação, os tecidos foram incluídos em parafina, seccionados a uma espessura de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina, após isso foi feita leitura em microscópio óptico com aumento de 400x (LUNA, 1968).

4.9 Análise estatística

O delineamento experimental foi realizado com seis repetições, no esquema fatorial 2x8, originando 16 tratamentos e totalizando 96 observações. A análise teve dois fatores: inoculação e dias após inoculação. O fator “Inoculação” foi composto pelos tratamentos: C – controle e I - inoculado. O fator “Dias após inoculação” foi composto por: D1 – 0 dia, D2 – 7º dia, D3 – 14º dia, D4 – 21º dia, D5 – 28º dia, D6 – 35º dia, D7 – 42º dia e D8 – 49º dia. A verificação estatística da significância dos tratamentos foi feita pela análise de variância (ANOVA) GLM. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey, com 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas pelo software estatístico SAS versão 9.1.2 (2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As doenças da reprodução podem interferir nos índices de natalidade, taxa de gestação, retorno ao cio, natimortos, entre outros, ou seja, causar prejuízos. No entanto a maioria dessas disfunções geralmente passam despercebidas por falta de monitoração. Quando observadas, normalmente a maioria dos casos de falha na reprodução são atribuídos às fêmeas, quando na verdade essa anomalia deveria ser dividida com os machos, que podem transmitir grande número de doenças infecciosas por meio da monta natural e da inseminação artificial, além de provocar uma série de desordens reprodutivas na fertilidade do rebanho.

No caso da IBR, a infecção nos touros possui caráter considerável na disseminação da enfermidade por meio da cópula devido às lesões no pênis e no prepúcio e à presença no sêmen contaminado, que podem transmitir o vírus às fêmeas sadias. Entretanto, em alguns touros infectados pelo BoHV-1, os sinais nos aparelhos reprodutivos e até mesmo os sinais respiratórios característicos dessa infecção na fase aguda são imperceptíveis ou de curta duração. Em decorrência disso, as informações obtidas, por meio de algumas análises laboratoriais realizadas em amostras de animais infectados por esse vírus, podem levar ao diagnóstico tardio em relação ao início da infecção no rebanho.

Devido aos fatores relacionados acima, este trabalho procurou caracterizar as disfunções em touros jovens conforme a evolução da infecção pelo BoHV-1 monitorando ao mesmo tempo a temperatura corpórea, os sinais clínicos, os títulos de anticorpos no soro sanguíneo, a presença de material genético viral em amostras de sêmen e a qualidade espermática. Os resultados observados foram comparados com parâmetros das análises de um grupo de touros controle. As técnicas de avaliação do sêmen foram utilizadas com o objetivo de identificar, ainda nas propriedades rurais, possíveis alterações espermáticas que pudessem ser atribuídas à infecção por esse vírus. O experimento também realizou análises histopatológicas em fragmentos de testículos e epidídimos dos dois grupos de touros, inoculados e controle, visando caracterizar quaisquer alterações histopatológicas ocasionadas pela ação do BoHV-1 após a fase aguda da doença.

5.1 Monitoração da temperatura corpórea

Tabela 3. Temperatura corpórea dos grupos de touros controle (números 1 a 6) e inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1, medida durante 14 dias.

Animal	Temperatura corpórea (d)*															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Touros Controle	1	39,1	38,9	39,0	38,9	38,8	39,0	38,7	38,9	38,9	38,6	38,8	38,9	38,7	38,5	38,6
	2	38,7	38,9	38,7	38,8	38,8	38,6	38,8	39,0	38,9	38,7	38,7	38,8	39,0	38,6	38,7
	3	38,8	38,8	39,1	39,0	38,9	38,8	38,8	39,3	38,8	39,2	38,9	39,0	38,7	38,5	38,9
	4	39,0	38,9	39,2	39,0	39,1	39,0	38,9	39,1	39,0	38,8	38,8	39,0	38,9	39,0	38,8
	5	38,9	39,0	38,9	38,8	39,2	39,0	38,8	39,1	38,7	39,0	38,6	39,1	38,8	38,8	39,1
	6	38,8	38,7	39,0	38,9	38,8	39,1	39,0	38,8	38,7	39,0	39,1	38,7	38,9	39,0	38,8
Touros Inoculados	7	38,8	38,7	39,3	40,0	40,2	40,5	40,1	39,9	39,4	39,5	39,0	38,7	38,9	39,0	38,8
	8	38,9	39,0	39,5	40,1	40,0	40,3	39,7	39,3	39,3	38,8	38,9	38,9	38,7	38,8	38,7
	9	38,8	38,8	39,2	40,1	39,9	40,2	40,0	39,5	39,3	38,9	38,9	39,0	38,8	38,9	38,8
	10	39,1	39,0	39,3	40,3	40,0	40,1	39,9	39,5	39,3	39,0	39,0	38,9	39,0	38,8	38,9
	11	38,6	38,8	39,3	39,5	39,9	41,0	40,5	39,9	39,2	39,0	38,7	38,9	38,8	38,6	38,7
	12	38,8	38,9	39,4	39,9	40,0	41,0	40,3	40,0	39,5	39,3	39,0	38,9	38,8	39,0	38,9

* Dias antes e após a inoculação

Todos os seis touros jovens inoculados com o BoHV-1 apresentaram aumento na temperatura corpórea (> 39,5), porém em períodos e graus variados. Os touros de números 7, 8, 9, 10 e 12 manifestaram hipertermia a partir do terceiro dia pós-inoculação, enquanto o touro de número 11 aumentou a temperatura corpórea no quarto dia pós-inoculação viral. Três touros, os de números 8, 9 e 10, permaneceram com hipertemia até o sexto dia, e três, os de números 7, 11 e 12, até o sétimo dia após a inoculação do vírus BoHV-1. Nenhum dos touros do grupo controle manifestou hipertermia durante os dias do estudo (Tabela 3). Bitsch (1973) também detectou aumento da temperatura corpórea em dois touros inoculados pelas vias respiratória e intraprepucial com o vírus BoHV-1 entre os dias 4 e 9 após a infecção experimental. Já Vogel et al. (2004) não observaram aumento da temperatura corpórea em nenhum dos quatro touros inoculados com o BoHV-1, só que nesse referido estudo os animais foram inoculados apenas pela via intraprepucial.

5.2 Monitoração dos sinais clínicos

Tabela 4. Sinais clínicos no grupo de touros controle (números 1 a 6) e inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1, monitorados durante 17 dias do experimento.

Animal	Sinais clínicos (d)*																	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Touros Controle	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Touros Inoculados	7	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	8	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++
	9	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++
	10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	11	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	12	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-

* Dias antes e após a inoculação

Ausência de sinais clínicos -, edema e hiperemia no prepúcio +, edema, hiperemia, vesículas, pústulas e úlceras no prepúcio ++, edema, hiperemia, vesículas, pústulas, úlceras no prepúcio e sinais respiratórios +++.

Só os touros inoculados apresentaram alguns sinais clínicos característicos da infecção pelo BoHV-1, porém essas manifestações ocorreram em tempos distintos e em graus variáveis conforme o touro, como mostra a Tabela 4. No caso de sinais clínicos relacionados à doença reprodutiva, o touro de número 10 apresentou a forma mais branda da infecção, com edema e hiperemia no prepúcio, iniciando no terceiro e permanecendo até o décimo quinto dia PI. Os animais de número 7, 11 e 12, além de edema e hiperemia, apresentaram vesículas no prepúcio entre o terceiro e o décimo sexto dia PI. De modo semelhante, Bitsch (1973) detectou, em dois touros inoculados com o BoHV-1, pústulas na mucosa peniana, úlceras e áreas hiperêmicas na mucosa do prepúcio, entre o 8º e o 23º dia PI. Também foram observados por Van Oirschot (1995), após a inoculação intraprepucial com o vírus BoHV-1, pontos escuro-avermelhados, vesículas e pústulas nas mucosas prepuciais de todos os touros infectados experimentalmente. O autor reportou, ainda, que algumas dessas lesões, posteriormente, formaram placas, úlceras e originaram infecções bacterianas

secundárias, que resultaram em uma descarga prepucial purulenta. Da mesma forma, Vogel et al. (2004) observaram balanopostite grave, caracterizada por vermelhidão do pênis e da mucosa do prepúcio acompanhada de vesículas e exsudato fibrinoso em todos os touros inoculados com o BoHV-1 pela via intraprepucial, tendo esses sinais diminuído gradualmente até o 14^o dia PI. Henzel (2008) também identificou, após inoculação intravaginal com o BoHV-1, o aparecimento de sinais moderados a severos de vulvovaginite, que foram inicialmente observados no 2^o dia PI, sendo caracterizados por congestão e edema da mucosa vulvovestibular e da vagina posterior.

Apenas os touros de número 8 e 9 apresentaram, além dos sinais clínicos de infecção prepucial (edema, hiperemia e vesículas), exsudato nasal, detectado entre o terceiro e o oitavo dia PI.

Bitsch (1973) e Belknap et al. (1994) também observaram sinais respiratórios em todos os touros inoculados com o BoHV-1. No primeiro trabalho, além do exsudato nasal, houve descrição de conjuntivite unilateral em um dos animais inoculados. Já Vogel et al. (2004), que inocularam touros com o BoHV-1, e Henzel (2008), que infectaram experimentalmente bezerras com o mesmo vírus, não observaram nenhum sinal respiratório nos touros inoculados durante todo o experimento.

Apesar de a fase aguda da doença se desenvolver em período rápido, de aproximadamente sete dias, os sinais clínicos originados com a enfermidade, quando não curados, podem permanecer por um período maior que 14 dias, ocasionando transtornos à saúde do animal (KAHRS, 1997). Nos touros observados no presente estudo, os sinais clínicos foram evidentes e permaneceram por um tempo menor do que o período de 28 dias de detecção do BoHV-1 no sêmen, e o de anticorpos no soro, que foram detectados depois do aparecimento dos sinais clínicos, ou seja, 14 dias após a infecção experimental. A Figura 1 mostra as lesões no aparelho reprodutivo detectadas no touro de número 7, e a Figura de número 2 permite a visualização de sinais respiratórios detectados no touro de número 9, ambos os touros infectados experimentalmente com o vírus BoHV-1.



Figura 1. Manifestação clínica com edema, hiperemia e úlceras no prepúcio, após 8 dias de inoculação com o BoHV-1 do touro número 7.



Figura 2. Manifestação clínica com exsudato nasal, após 7 dias de inoculação com o BoHV-1 do touro número 9.

5.3 Reação de vírusneutralização (VN)

Tabela 5. Títulos de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 obtidos no teste de VN de amostras sanguíneas colhidas ao longo do tempo de touros do grupo controle (números 1 a 6) e do grupo de touros inoculados (números 7 a 12).

Animal	Dias após a inoculação								
	0	7	14	21	28	35	42	49	
Touros Controle	1	< 2*	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	3	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	4	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	5	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	6	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Touros Inoculados	7	< 2	< 2	8	32	128	512	128	32
	8	< 2	< 2	8	64	256	512	128	32
	9	< 2	< 2	8	32	128	512	256	64
	10	< 2	< 2	4	32	128	128	64	8
	11	< 2	< 2	8	32	64	128	64	16
	12	< 2	< 2	8	32	128	512	512	128

* Título expresso como a recíproca da maior diluição do soro capaz de impedir a replicação do vírus no teste de vírusneutralização.

Ocorreu a soroconversão em todos os touros inoculados, com a detecção de anticorpos VN a partir do 14^o dia pi, com títulos iniciais de 4 ou 8, que posteriormente atingiram um máximo de 512 no 35^o dia PI e declinaram gradativamente até o final do experimento de 49 dias de colheita.

A soroconversão dos touros de números 10 e 11 atingiu títulos de até 128, entretanto os de números 7, 8, 9 e 10 apresentaram ápice com título de 512. Os títulos na VN primeiro aumentaram e depois começaram a diminuir a partir do 42^o dia pi. Estes dados estão apresentados na Tabela 5. De forma semelhante, Henzel (2008), após a inoculação de bezerras pela via intravaginal, observou soroconversão em todos os touros inoculados com o vírus BoHV-1 no 28^o dia PI, apesar de esses touros apresentarem títulos entre 4 e 32, portanto menores do que os dos touros do presente experimento. Vogel et al. (2004) também observaram soroconversão em todos os quatro touros, com títulos variando entre 32 e 64, após 30 dias de inoculação com o vírus BoHV-1, apresentando da mesma forma títulos menores do que o presente trabalho. Resultados que podem ser atribuídos, as respectivas doses de 3 e 2 mL e a inoculação experimental apenas pela via reprodutiva utilizadas nesses referidos experimentos.

Bitsch (1973) observou que os dois touros inoculados com o BoHV-1 apresentaram títulos de anticorpos de 64 para o touro A e de 128 para o touro B, após 30 dias de infecção experimental.

Belknap et al. (1994) detectaram em bezerros inoculados com o vírus BoHV-1 neurovirulento, títulos de anticorpos que variaram entre 256 e 512 após 30 dias, declinando para níveis entre 16 e 32 após 60 dias de inoculação experimental. Gungor e Okzul (2007), por meio da técnica de VN, analisaram amostras de soro sanguíneo provenientes de um grupo de novilhas infectadas naturalmente pelo BoHV-1, colhidas em seis períodos distintos durante dois anos e observaram títulos que variaram entre 4 e 128, valores similares aos observados em infecções experimentais. Para os autores, oscilações nos títulos VN durante o longo período de observação podem ter sido ocasionadas por recidivas da infecção primária ou até mesmo por reinfecções com estirpes diferentes.

5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A análise pela técnica de PCR resultou na amplificação de produtos com 160 pb em vinte amostras provenientes das colheitas de sêmen realizadas com intervalo de sete dias nos touros inoculados com o BoHV-1. A Tabela 6 apresenta um resumo da comprovação do DNA após a inoculação viral. Em todos os touros infectados foi constatado material genético do BoHV-1. Nos touros de número 8, 10, 11 e 12 foi detectado o DNA viral aos 7, 14 e 21 dias PI, já nos touros de número 7 e 9 o DNA do vírus foi identificado por uma semana a mais, ou seja, até o 28º dia pi. Por outro lado, todos os touros do grupo controle apresentaram resultados negativos na referida técnica. Van Engelenburg et al. (1995), também por meio da técnica de PCR, identificaram o material genético do BoHV-1 em 118 amostras de sêmen, de oito touros inoculados apenas pela via intraprepucial, colhidas nos dias 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 PI.

Tabela 6. Resultados da PCR em amostras de sêmen de touros do grupo controle (números 1 a 6) e do grupo de touros inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1.

Animal	Dias após a inoculação								
	0	7	14	21	28	35	42	49	
Touros Controle	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Touros Inoculados	7	-	+	+	+	+	-	-	-
	8	-	+	+	+	-	-	-	-
	9	-	+	+	+	+	-	-	-
	10	-	+	+	+	-	-	-	-
	11	-	+	+	+	-	-	-	-
	12	-	+	+	+	-	-	-	-

(-) Negativo para o vírus, (+) Positivo para o vírus

Smiths et al. (2000), da mesma forma, por meio da técnica de PCR e após inoculação do BoHV-1 pela via intraprepucial, identificaram o DNA do vírus em amostras de sêmen entre o 1º e o 44º dia PI. Neste estudo, Smiths et al. (2000) analisaram três técnicas de PCR, as quais detectaram a presença de material genético do BoHV-1 em 100% das amostras quando foi usada a técnica A, em 98% das amostras com a técnica B e em 73% das amostras com a técnica C, fato que demonstrou a eficácia da técnica de PCR para o diagnóstico do BoHV-1 em amostras de sêmen de touros com infecção recente.

Os resultados obtidos por meio da técnica de PCR, para detecção do DNA do BoHV-1, após as inoculações experimentais do presente trabalho, foram similares aos observados por ROCHA et al. (1998), que também usando a técnica de PCR identificaram material genético do BoHV-1 em amostras de sêmen de touros infectados naturalmente em centrais de colheita de sêmen. Os dados obtidos demonstram a assertividade da aplicação da técnica de PCR para identificação do DNA do BoHV-1 em diferentes tipos de amostras, independentemente da quantidade ou da origem do material a ser analisado. Essas observações são reforçadas pelos resultados de Moore, Gunn e Walls (2000), que também, por meio do teste de PCR, detectaram o BoHV-1 em 105 amostras de swabs nasais provenientes de bovinos com doença respiratória, e de Silva (2009), que detectou o BoHV-1 em 3 amostras de swabs nasais de animais com doença respiratória, em 2 amostras de sangue de vacas com vulvovaginite, em 1 amostra de sêmen de um touro com balanopostite e em 5 amostras de sêmen oriundas de uma central de colheita de sêmen.

Alegre, Nanni e Fondevila (2001), utilizando a técnica PCR multiplex, detectaram o DNA do BoHV-1 em três amostras de sêmen provenientes de animais inoculados pela via intranasal.

Chandranaik (2010) detectou o material genético do BoHV-1 em quatro amostras de sêmen provenientes de centrais de colheitas de sêmen, por meio da técnica de PCR em tempo real. Oliveira et al. (2011), por meio da técnica do tipo nested (nPCRs), detectaram o DNA do BoHV-1 em 34 amostras de sêmen provenientes de touros que não apresentavam sinais clínicos de infecção por esse vírus. Esses resultados reforçaram a preocupação do presente trabalho, que identificou o material genético do BoHV-1 no grupo dos touros inoculados até o 28º dia PI, período em que esses animais já não apresentavam sinais clínicos característicos da IBR/IPB. Da mesma forma, Van Engelenburgg et al. (1995) e Smiths et al. (2000) detectaram o DNA do BoHV-1 no sêmen de animais infectados experimentalmente

por até 30 e 44 dias PI, respectivamente. Resultados que fortalecem um dos objetivos do presente trabalho em investigar a possibilidade do BoHV-1 infectar o sêmen e interferir na sua qualidade, durante e após o período de infecção aguda.

Para identificar possíveis alterações na qualidade do sêmen do grupo de animais inoculados com o BoHV-1, cujo material genético foi detectado entre o 7º e o 28º dia PI, foram realizadas avaliações de volume seminal, concentração, motilidade, vigor, defeitos espermáticos e integridade dos acrossomos e membranas plasmáticas dos espermatozoides, em todas as amostras de sêmen dos dois grupos de touros, controle e inoculados, colhidas durante todo o experimento. A Figura 3 mostra os produtos amplificados pela PCR neste trabalho.



Legenda: Canaletas M – DNA " ladder" Promega®
 Canaletas 1,15,29,43 e 57 – controles positivos BoHV-1
 Canaletas 2,16,30,44 e 58 - controles negativos Promega®
 Canaletas 3,4,5,6,7 e 8 – amostras dos animais 1,2,3,4,5 e 6 do grupo controle
 Canaletas 9,10,11,12,13 e 14 – amostras dos animais 7,8,9,10,11 e 12 coletadas dia 0, antes da inoculação do grupo com o vírus, BoHV-1
 Canaletas 17,18,19,20,21 e 22 - amostras coletadas, 7 dias após a inoculação dos animais 7,8,9,10,11 e 12.
 Canaletas 23,24,25,26,27 e 28 - amostras coletadas, 14 dias após a inoculação dos animais 7,8,9,10,11 e 12.
 Canaletas 31,32,33,34,35 e 36 – amostras coletadas, 21 dias após a inoculação dos animais 7,8,9,10,11 e 12.
 Canaletas 37,38,39,40,41 e 42 - amostras coletadas, 28 dias após a inoculação dos animais 7,8,9,10,11 e 12.
 Canaletas 45,46,47,48,49 e 50 – amostras coletadas, 35 dias após a inoculação dos animais 7,8,9,10,11 e 12.
 Canaletas 51,52,53,54,55 e 56 – amostras coletadas, 42 dias após a inoculação dos animais 7,8,9,10,11 e 12.
 Canaletas 59,60,61,62,63 e 64 – amostras coletadas, 49 dias após a inoculação dos animais 7,8,9,10,11 e 12.

Figura 3. Análise para detecção do material genético viral, por eletroforese em gel de agarose com 2% de brometo de etídio, dos produtos (160 pb) amplificados pela PCR em amostras de sêmen do grupo de touros controle (números 1 a 6) e inoculados (números 7 a 12) com o BoHV-1.

5.5 Volume e Concentração Seminal

No presente trabalho, o volume do ejaculado e a concentração espermática foram as primeiras características seminais avaliadas.

Os valores médios de volume de sêmen e concentração espermática observados *in natura* nos touros dos grupos controle e inoculados com o BoHV-1 estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Média \pm desvio padrão do volume (mL) e concentração espermática no sêmen fresco do grupo de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.

Dias	Parâmetros de volume e concentração espermática avaliados			
	Volume espermático (mL)		Concentração de espermatozoides (10^6 sptz/mL)	
	Grupo C	grupo I	Grupo C	Grupo I
D-0	5,23 \pm 0,27Aa*	4,91 \pm 0,53Aa	496,33 \pm 22,31Aa	513,00 \pm 26,34Aa
D-7	5,15 \pm 0,42Aa	5,40 \pm 0,20Aa	507,50 \pm 42,27Aa	519,00 \pm 26,68Aa
D-14	5,58 \pm 0,31Aa	5,21 \pm 0,42Aa	494,50 \pm 35,85Aa	523,83 \pm 24,84Aa
D-21	4,98 \pm 0,54Aa	5,30 \pm 0,35Aa	518,66 \pm 22,70Aa	504,66 \pm 24,51Aa
D-28	5,43 \pm 0,22Aa	4,93 \pm 0,51Aa	503,50 \pm 24,96Aa	524,50 \pm 16,30Aa
D-35	5,13 \pm 0,44Aa	5,35 \pm 0,23Aa	515,50 \pm 18,51Aa	497,50 \pm 12,16Aa
D-42	5,28 \pm 0,25Aa	5,01 \pm 0,45Aa	489,50 \pm 32,41Aa	517,33 \pm 19,69Aa
D-49	5,46 \pm 0,19Aa	5,33 \pm 0,30Aa	501,33 \pm 19,31Aa	520,16 \pm 33,70Aa

* Nas colunas, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), e nas linhas, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), para cada parâmetro avaliado.

As médias dos volumes de sêmen variaram de 4,98 \pm 0,54 mL a 5,58 \pm 0,31 mL no grupo de touros controle e de 4,91 \pm 0,53 mL a 5,40 \pm 0,20 mL no grupo de touros inoculados. As médias apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$), tanto quando analisados os resultados entre grupos, como quando analisadas as médias dentro de cada grupo, ao longo do tempo.

Em relação à concentração espermática, os resultados encontrados variaram de 489,50 \pm 35,49 $\times 10^6$ sptz/mL a 518,66 \pm 22,70,09 $\times 10^6$ sptz/mL no grupo de touros controle e de 497,50 \pm 12,16 $\times 10^6$ sptz/mL a 524,50 \pm 16,30 $\times 10^6$ sptz/mL no grupo de touros inoculados. As médias apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$), tanto quando analisados os resultados entre grupos, como quando analisadas as médias dentro de cada grupo, ao longo do tempo.

Os resultados das médias de volumes e concentrações espermáticas encontradas nos dois grupos de touros, controle e inoculados, se alternaram entre aumentos e diminuições, conforme o dia de colheita, porém sem indicação da influência do BoHV-1, mesmo tendo sido detectado material genético viral no sêmen dos touros inoculados nas primeiras semanas deste experimento.

Como não existem dados com o BoHV-1 na literatura pertinente, então só é possível uma comparação mais ampla com outros agentes. Desse modo, Paton et al. (1989) detectaram, em um grupo de touros inoculados experimentalmente com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), redução nas médias de concentração espermática, de 58×10^8 sptz/mL, encontrada no início da pesquisa, para valores inferiores a 10×10^8 sptz/mL após 40 dias do início da infecção experimental, entretanto nesse estudo os volumes seminais não foram relatados.

Galvão (2009), analisando amostras de sêmen de dois grupos de touros, um grupo com infestação experimental de *Dermatobia hominis* na bolsa escrotal e outro grupo controle, detectou diferença significativa entre as médias de volume espermático encontradas nos dois grupos, que foram de 7,4 mL no grupo de touros controle e de 5,7 mL no grupo de touros infestados, e nas médias de concentração espermática, que foram de $69,2 \times 10^8$ sptz/mL no grupo de touros controle e de $35,7 \times 10^8$ sptz/mL no grupo de touros infestados, demonstrando diferença estatística significativa entre as amostras analisadas e possível interferência da infestação experimental pela *D. hominis* nos resultados encontrados.

Da mesma forma, Sekoni et al. (2004) analisaram volumes e concentrações espermáticas em amostras de sêmen oriundas de quatro touros inoculados experimentalmente com o *Trypanosoma vivax* e detectaram após a inoculação experimental diminuição das concentrações espermáticas de $1650,5 \times 10^6$ sptz/mL, antes da infecção experimental, para índices de $200,50 \times 10^6$ sptz/mL doze semanas após a inoculação. No mesmo período, os volumes seminais médios reduziram de 5,8 mL detectados no início para 1,0 mL no final do experimento. Possivelmente as reduções das concentrações e volumes espermáticos observadas nesse estudo foram influenciadas pela ação do *Trypanosoma vivax* detectado no sangue desses touros após a infecção experimental.

Já Martins et al. (2011) não identificaram diferença estatisticamente significativa em relação aos volumes espermáticos médios de dois grupos de touros da raça Gir, com idades de maturidade sexual diferentes, que foram

respectivamente de $5,3 \text{ mL} \pm 1,8$ no grupo de touros que apresentaram maturidade sexual precoce e de $5,0 \text{ mL} \pm 1,6$, no grupo de touros que apresentaram maturidade sexual tardia.

5.6 Motilidade Espermática

Os resultados referentes à porcentagem de motilidade das células espermáticas dos grupos controle e inoculados, antes do congelamento e após o descongelamento, estão organizados na Tabela 8. As médias encontradas no grupo controle tiveram percentuais que variaram entre $70,00\% \pm 6,32\%$ e $78,83\% \pm 4,08\%$, cuja análise estatística demonstrou ausência de diferença significativa entre os resultados encontrados ($p \geq 0,05$). Para o grupo de touros inoculados, as médias encontradas apresentaram limites de motilidade entre $71,66\% \pm 4,08\%$ e $76,66\% \pm 5,16\%$, cuja análise também mostrou ausência de diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$) e uniformidade entre as médias analisadas.

Tabela 8. Média \pm desvio padrão das porcentagens de motilidade de espermatozoides no sêmen fresco e pós-descongelamento proveniente do grupo de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.

Dias	Parâmetros de motilidade de espermatozoides avaliados em (%)			
	Antes Congelamento		Após Descongelamento	
	C	I	C	I
D-0	$71,66 \pm 4,08Aa^*$	$73,33 \pm 5,16Aa$	$38,33 \pm 6,32Aa$	$43,33 \pm 8,16Aa$
D-7	$73,33 \pm 5,16Aa$	$76,66 \pm 5,16Aa$	$40,00 \pm 7,83Aa$	$46,66 \pm 5,16Aa$
D-14	$78,33 \pm 4,08Aa$	$75,00 \pm 5,47Aa$	$45,00 \pm 5,47Aa$	$43,33 \pm 5,16Aa$
D-21	$75,00 \pm 5,47Aa$	$76,66 \pm 5,16Aa$	$41,66 \pm 7,52Aa$	$45,00 \pm 5,47Aa$
D-28	$76,66 \pm 5,16Aa$	$73,33 \pm 5,16Aa$	$43,33 \pm 8,16Aa$	$40,00 \pm 7,52Aa$
D-35	$70,00 \pm 6,32Aa$	$75,00 \pm 5,47Aa$	$38,33 \pm 7,52Aa$	$41,66 \pm 6,32Aa$
D-42	$75,00 \pm 5,47Aa$	$71,66 \pm 4,08Aa$	$40,00 \pm 8,16Aa$	$45,00 \pm 5,47Aa$
D-49	$73,33 \pm 8,16Aa$	$75,00 \pm 5,47Aa$	$43,33 \pm 6,32Aa$	$46,66 \pm 5,16Aa$

* Nas colunas, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), e nas linhas, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), para cada parâmetro avaliado.

Comparando as médias dos dois grupos, em todos os tempos de colheita, verificou-se que não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$). Em ambos os grupos as médias de porcentagem de motilidade aumentaram na primeira colheita pós-

inoculação, entretanto os resultados posteriores aumentaram e diminuíram alternadamente até a última colheita, aos 49 dias.

As médias da motilidade pós-descongelamento encontradas no grupo controle tiveram percentuais entre $38,33\% \pm 6,32\%$ e $45,00\% \pm 5,47\%$, cuja análise estatística demonstrou ausência de diferença significativa entre os resultados encontrados ($p \geq 0,05$). Para os touros inoculados com o BoHV-1, as médias de motilidade tiveram percentuais que variaram entre $40,00\% \pm 7,83\%$ e $46,66\% \pm 5,16\%$, indicando resultados estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$) entre os dados obtidos.

Comparando os percentuais de todas as médias de motilidade nos dois grupos pós-descongelamento, verificou-se ausência de diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$). Os resultados obtidos demonstraram uniformidade entre as amostras testadas em todos os períodos de colheita. Nos dois grupos, as médias aumentaram e diminuíram em períodos alternados até o final do trabalho.

Os resultados de motilidade espermática detectados antes e após a descongelação do sêmen no grupo de touros inoculados, possivelmente, não foram relacionados à presença do BoHV-1, pois ocorreram alternâncias entre aumentos e diminuições dos percentuais médios encontrados, durante todo período do experimento, independentemente da presença do vírus, cujo material genético foi detectado nas amostras desses animais apenas nas primeiras semanas PI. Da mesma forma Souza et al. (2011) observaram percentuais médios de motilidade espermática de $58,9 \pm 12,74\%$ em amostras de sêmen de touros infectados com o BoHV-5 e de $63,2 \pm 12,64\%$ em amostras de sêmen de touros controle do mesmo experimento, demonstrando similaridade estatística entre os percentuais médios encontrados.

Semelhante aos resultados anteriores mas com outro vírus, Whitmore et al. (1977) também detectaram similaridade estatística entre quatro amostras de sêmen de touros com isolamento viral positivo para o BVDV, após inoculação experimental com amostras de sêmen de um grupo de touros utilizados como controle. As amostras desses dois grupos apresentaram percentuais de motilidade espermática similares, com índices variando entre 60% e 75% durante todo o período da pesquisa.

Já Paton et al. (1989), também observando touros inoculados experimentalmente com o BVDV, detectaram redução nos percentuais de motilidade espermática em amostras de sêmen pós-descongelamento de 40% no início do

experimento para 20% após o vigésimo dia de inoculação experimental, indicando possível interferência do BVDV na redução da motilidade espermática detectada, após a infecção experimental. ALM et al. (2009) também detectaram possível interferência nos percentuais de motilidade espermática, que variaram entre 40% e 60% nas amostras de sêmen de 54 touros infectados naturalmente pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV).

5.7 Vigor Espermático

A classificação do vigor espermático está organizada na Tabela 9. As médias encontradas no grupo controle variaram entre um mínimo de $3,33 \pm 0,51\%$ e um máximo de $3,83 \pm 0,40\%$, cuja análise estatística demonstrou ausência de diferença significativa entre os resultados encontrados ($p \geq 0,05$). Para o grupo de touros inoculados com o BoHV-1, da mesma forma as médias apresentaram limites entre $3,33 \pm 0,51\%$ e $3,83 \pm 0,40\%$, resultados que demonstraram similaridade estatística ($p \geq 0,05$) entre as médias analisadas.

A análise comparativa das médias dos dois grupos em todas as etapas do experimento não mostrou diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$) entre as amostras testadas. Nos dois grupos, as médias do vigor espermático se intercalaram entre aumento e diminuição em cada grupo, até o fim do 49º dia do experimento.

Tabela 9. Médias \pm desvio padrão da escala (0 a 5) de vigor de espermatozoides no sêmen fresco e após descongelamento proveniente dos grupos de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.

Dias	Parâmetros de vigor de espermatozoides avaliados			
	Antes Congelamento		Pós Descongelamento	
	C	I	C	I
D-0	$3,66 \pm 0,51Aa^*$	$3,50 \pm 0,54Aa$	$2,66 \pm 0,51Aa$	$2,83 \pm 0,40Aa$
D-7	$3,33 \pm 0,51Aa$	$3,66 \pm 0,51Aa$	$2,50 \pm 0,54Aa$	$2,83 \pm 0,40Aa$
D-14	$3,83 \pm 0,40Aa$	$3,33 \pm 0,51Aa$	$3,00 \pm 0,00Aa$	$2,66 \pm 0,51Aa$
D-21	$3,83 \pm 0,40Aa$	$3,83 \pm 0,40Aa$	$2,83 \pm 0,40Aa$	$3,00 \pm 0,00Aa$
D-28	$3,33 \pm 0,51Aa$	$3,50 \pm 0,54Aa$	$2,66 \pm 0,51Aa$	$3,00 \pm 0,00Aa$
D-35	$3,50 \pm 0,54Aa$	$3,83 \pm 0,40Aa$	$3,00 \pm 0,00Aa$	$2,66 \pm 0,51Aa$
D-42	$3,83 \pm 0,40Aa$	$3,66 \pm 0,51Aa$	$2,83 \pm 0,40Aa$	$3,00 \pm 0,00Aa$
D-49	$3,50 \pm 0,54Aa$	$3,66 \pm 0,51Aa$	$2,50 \pm 0,54Aa$	$2,83 \pm 0,40Aa$

*Nas colunas, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), e nas linhas, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), para cada parâmetro avaliado.

As médias referentes ao vigor espermático pós-descongelamento no grupo controle variaram entre $2,50 \pm 0,54\%$ e $3,00 \pm 0,00\%$, cuja análise estatística demonstrou ausência de diferença significativa dentro do grupo ao longo do tempo. ($p \geq 0,05$). Os touros inoculados com o BoHV-1 obtiveram médias que variaram entre $2,66 \pm 0,54\%$ e $3,00 \pm 0,00\%$, indicando semelhança estatística ($p \geq 0,05$) entre os dados analisados.

Comparando todas as médias do vigor espermático dos dois grupos concomitantemente na etapa pós-descongelamento, verificou-se ausência de diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$). Os resultados apresentados demonstraram similaridade entre as amostras testadas, em todos os períodos de colheita. Nos dois grupos, as médias aumentaram e diminuíram em períodos alternados de colheitas até o final do estudo.

Os resultados de vigor espermático detectados antes e após a descongelação do sêmen no grupo de touros inoculados, da mesma forma como foi observado na avaliação de motilidade espermática, possivelmente não sofreram interferência do BoHV-1, pois ocorreram alternâncias entre aumentos e diminuições dos percentuais médios durante todo o período do experimento, independentemente da presença do vírus, cujo material genético foi detectado nas amostras desses animais apenas nas primeiras semanas pi.

Também com outro agente, Galvão (2009) detectou similaridade estatística ($p \geq 0,05$) no valor médio de vigor espermático de 3,5 encontrado no grupo de touros controle, comparado com o resultado 3,0 encontrado no grupo de touros infestados experimentalmente pela *D.hominis*. Com isso, concluiu que a infestação pela *D.hominis* não interferiu nos valores de vigor espermático detectados durante o experimento.

Já Buzinhani et al. (2011) detectaram redução nos valores médios de vigor espermático de 3,5 para 2,5 em amostras de sêmen de touros infectadas experimentalmente com *Ureaplasma diversum*, demonstrando diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados encontrados.

5.8 Defeitos Espermáticos

Tabela 10. Médias \pm desvio padrão das porcentagens de defeitos maiores, defeitos menores e totais de espermatozoides do grupo de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.

Dias	Parâmetros de defeitos espermáticos avaliados em (%)					
	Maiores		Menores		Totais	
	C	I	C	I	C	I
D-0	11,25 \pm 1,50Aa*	10,41 \pm 2,06Aa	8,00 \pm 1,26Aa	8,50 \pm 1,44Aa	19,25 \pm 1,47Aa	18,91 \pm 1,82Aa
D-7	10,50 \pm 1,54Aa	11,33 \pm 1,32Aa	7,50 \pm 1,18Aa	7,67 \pm 1,16Aa	18,00 \pm 1,44Aa	19,00 \pm 1,24Aa
D-14	12,75 \pm 1,03Aa	11,00 \pm 1,81Aa	7,33 \pm 1,21Aa	7,83 \pm 1,47Aa	20,08 \pm 1,02Aa	18,83 \pm 1,66Aa
D-21	10,66 \pm 1,80Aa	11,75 \pm 1,21Aa	8,00 \pm 1,41Aa	7,41 \pm 1,28Aa	18,66 \pm 2,18Aa	19,17 \pm 1,15Aa
D-28	11,00 \pm 1,37Aa	10,50 \pm 1,18Aa	8,33 \pm 1,08Aa	7,17 \pm 1,12Aa	19,33 \pm 1,63Aa	17,67 \pm 2,06Aa
D-35	12,25 \pm 1,17Aa	11,08 \pm 1,82Aa	7,25 \pm 1,54Aa	8,75 \pm 1,28Aa	19,50 \pm 1,70Aa	19,83 \pm 2,60Aa
D-42	10,75 \pm 2,08Aa	10,91 \pm 1,82Aa	7,50 \pm 1,26Aa	7,00 \pm 1,04Aa	18,25 \pm 2,50Aa	17,91 \pm 1,46Aa
D-49	12,50 \pm 1,51Aa	10,25 \pm 2,00Aa	7,75 \pm 1,12Aa	8,25 \pm 1,36Aa	20,25 \pm 1,08Aa	18,50 \pm 1,03Aa

* Nas colunas, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), e nas linhas, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), para cada parâmetro avaliado.

Os resultados percentuais de defeitos maiores, menores e totais dos grupos de touros controle e inoculados estão dispostos na Tabela 10. Os percentuais médios de defeitos maiores encontrados variaram de 10,50% \pm 1,54% a 12,75% \pm 1,03% no grupo de touros controle e de 10,25% \pm 2,00% a 11,75% \pm 2,47% no grupo de touros inoculados com o BoHV-1. A análise comparativa das médias dos dois grupos em todos os dias do experimento e em cada grupo independente não apresentou resultados estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$).

Em relação aos defeitos menores, os percentuais médios encontrados variaram de 7,25% \pm 1,54% a 8,33% \pm 1,08% no grupo de touros controle e de 7,00% \pm 1,04% a 8,75% \pm 1,28% no grupo de touros inoculados com o BoHV-1. Da mesma forma como aconteceu com os defeitos maiores, cuja análise foi similar estatisticamente ($p \geq 0,05$), as médias dos defeitos menores de cada grupo e a análise comparativa entre os dois grupos em todos os dias do experimento não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$). Essas médias nos touros inoculados com o BoHV-1 variaram durante todo tempo da pesquisa com índices similares.

Os percentuais médios de defeitos totais variaram de 18,00% \pm 1,44% a 20,25% \pm 1,08% nos grupos de touros controle e de 17,67% \pm 2,06% a 19,83% \pm 2,60% no grupo de touros inoculados com o BoHV-1, resultados que demonstraram

similaridade estatística ($p \geq 0,05$) entre as médias de cada grupo analisado. A análise comparativa das médias dos dois grupos correspondentes a todos os dias do experimento também não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$).

Os percentuais de defeitos espermáticos detectados nos espermatozoides do grupo de touros inoculados, possivelmente, não foram relacionados à presença do BoHV-1, pois, como foi observado com as outras características espermáticas avaliadas, ocorreram alternâncias entre aumentos e diminuições dos percentuais médios encontrados, durante todo período do experimento, independentemente da presença do vírus, cujo material genético foi detectado nas amostras desses animais apenas nas primeiras semanas PI.

Passos (2007) também identificou similaridade estatística entre os percentuais de defeitos espermáticos totais detectados nas amostras de sêmen de três grupos de touros da raça Nelore em uma mesma propriedade, que foram respectivamente de $14,4\% \pm 4,3\%$ no grupo 1, de $14,3\% \pm 7,3\%$ no grupo 2 e $13,9\% \pm 4,2\%$ no grupo 3, mantidos em locais diferentes.

Já Whitmore et al. (1977) observaram aumento nos percentuais dos defeitos espermáticos totais, maiores e menores após a infecção experimental de touros com o BVDV, sinalizando para uma possível interferência desse vírus nos percentuais de defeitos espermáticos detectados após a inoculação experimental. Da mesma forma, em touros inoculados experimentalmente e com isolamento de BVDV, Paton et al. (1989) também observaram aumento nos percentuais dos defeitos espermáticos totais, que no referido estudo variaram de 13% a 60% entre os dias 0 e 20 após a inoculação experimental.

Alm et al. (2009) analisaram amostras de sêmen de 54 touros infectados pelo BRSV e observaram percentual médio de defeitos totais de 26%, resultados superiores ao percentual médio de defeitos totais detectados nas amostras de 25 touros não infectados por esse vírus, que foi de 18,8%. Sekoni et al. (2004) também observaram aumento nos defeitos espermáticos totais, que variaram de 5,3% a 70%, entre a primeira e a quinta semana após a inoculação experimental com o *Trypanossoma congolense*.

Da mesma forma, Santos et al. (2008) também detectaram diferença estatisticamente significativa em relação aos percentuais médios de defeitos

espermáticos totais encontrados entre amostras de sêmen de dois grupos de touros, um grupo submetido e outro grupo não submetido a dieta contendo gossipol (toxina encontrada no caroço de algodão), que foram de $26,9 \pm 2,69\%$ e $20,2 \pm 1,5\%$ respectivamente. Esses resultados demonstraram a possível interferência do gossipol nos percentuais médios de defeitos espermáticos totais detectados nas amostras de sêmen dos animais submetidos à dieta contendo caroço de algodão.

5.9 Avaliação de Integridade da Membrana

Tabela 11. Médias \pm desvio padrão das porcentagens da integridade de membrana plasmática de espermatozoides do grupo de touros (C) controle e (I) inoculados com o BoHV-1.

Dias	Parâmetro de integridade de membrana avaliado em (%)	
	*C	*I
D-0	40,83 \pm 2,85 Aa*	39,50 \pm 3,20 Aa
D-7	39,83 \pm 2,71 Aa	42,33 \pm 3,44 Aa
D-14	41,66 \pm 2,06 Aa	40,50 \pm 2,88 Aa
D-21	39,16 \pm 2,22 Aa	41,16 \pm 3,18 Aa
D-28	41,00 \pm 2,28 Aa	43,00 \pm 4,09 Aa
D-35	38,83 \pm 3,54 Aa	40,83 \pm 2,63 Aa
D-42	40,33 \pm 1,96 Aa	39,33 \pm 2,33 Aa
D-49	39,00 \pm 3,16 Aa	40,16 \pm 2,92 Aa

* Nas colunas, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), e nas linhas, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística ($p \geq 0,05$), para o parâmetro avaliado.

Os percentuais de espermatozoides com membranas íntegras que constam na Tabela 11 variaram de $38,33\% \pm 3,54\%$ a $41,66\% \pm 2,06\%$ para os touros do grupo controle e de $39,33\% \pm 2,33\%$ a $43,00\% \pm 4,09\%$ para os touros inoculados. As médias encontradas nos dois grupos tiveram resultados semelhantes. A análise comparativa dos grupos e dos dias de cada grupo demonstrou similaridade estatística entre os resultados encontrados ($p \geq 0,05$). As médias percentuais de espermatozoides com membranas íntegras encontradas no grupo dos touros inoculados apresentaram resultados com pequenas variações em todo o tempo da pesquisa.

Os resultados detectados no grupo de touros inoculados, possivelmente, não sofreram interferência do BoHV-1, pois ocorreram alternâncias entre aumentos e diminuições dos percentuais médios, durante todo período do experimento, independentemente da presença do vírus, cujo material genético foi detectado nas amostras desses animais nas primeiras semanas PI.

Passos (2007) já havia observado, em 22 touros da raça Nelore, separados em três grupos e mantidos em três locais diferentes de uma mesma propriedade, durante o período de estação de monta, que não existe interferência nos percentuais de espermatozoides com membranas íntegras, pois obtiveram resultados de $61,3\% \pm 7,3$ no grupo 1, $63,4\% \pm 10,8$ no grupo 2 e $65,8\% \pm 13,4$ no grupo 3. Da mesma forma Alm (2009), analisando amostras de sêmen de touros infectados pelo BRSV, não observaram interferência desse vírus nos percentuais de espermatozoides com membranas íntegras, que ficou em $67,8\%$ mesmo após a infecção viral. Souza et al. (2011) identificaram similaridade estatística no percentual de membranas íntegras detectado nos espermatozoides de touros expostos ao BoHV-5, que foi de $46,3\% \pm 9,3\%$, quando comparado ao percentual de $55,0 \pm 6,0\%$ nos espermatozoides de touros utilizados como controle.

As evidências visuais sobre integridade ou lesões de membrana plasmática estão exemplificadas na Figura 4.

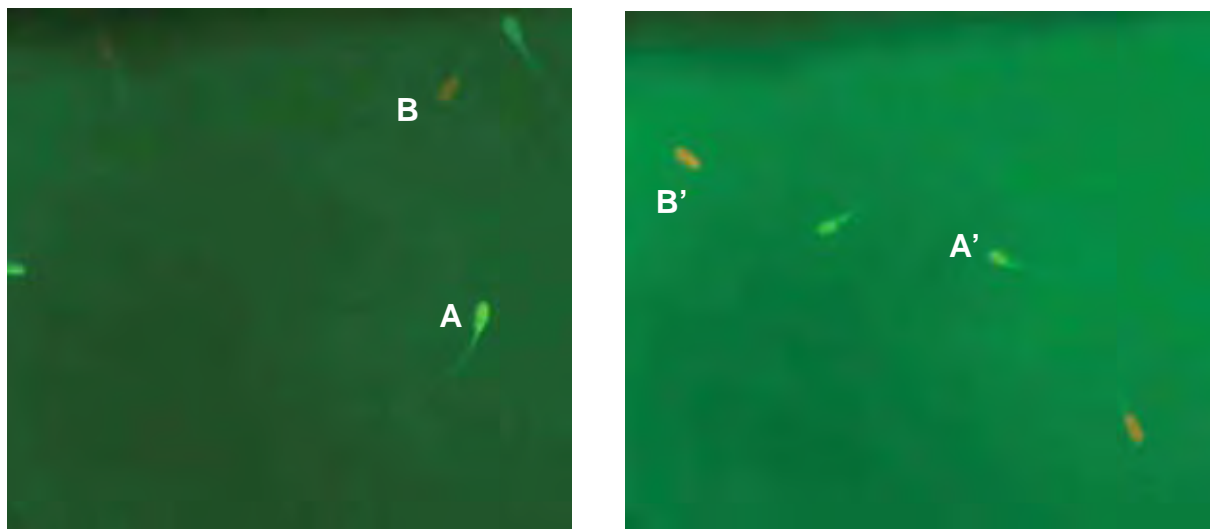


Figura 4. Espermatozoides corados com C-FDA e IP, demonstrando membrana plasmática íntegra (A) de touro controle e (A') de inoculado com o BoHV-1; membrana plasmática lesada (B) de touro controle e (B') de touro inoculado observados em microscópio de epifluorescência com aumento de 600x.

5.10 Avaliação de integridade de acrossomo

Os percentuais de espermatozoides vivos sem e com reação acrossomal e de espermatozoides mortos sem e com reação acrossomal estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Média \pm desvio padrão das porcentagens de espermatozoides vivos, sem reação acrossomal (S/R/A) e com reação acrossomal (C/R/A) e mortos (S/R/A) e (C/R/A) do sêmen dos grupos de touros controle (C) e inoculados (I) com o BoHV-1.

Dias	Grupos	Parâmetros de espermatozoides vivos e mortos com e sem reação acrossomal avaliados em (%)			
		Vivo		Morto	
		S/R/A	C/R/A	S/R/A	C/R/A
D-0	Controle	36,17 \pm 2,13Aa*	3,33 \pm 1,63 Aa	27,00 \pm 1,09 Aa	33,50 \pm 1,04 Aa
D-0	Inoculados	34,83 \pm 1,94Aa	3,00 \pm 1,54 Aa	28,17 \pm 1,32 Aa	34,00 \pm 3,26 Aa
D-7	Controle	34,50 \pm 2,07Aa	3,50 \pm 0,83 Aa	28,00 \pm 1,67 Aa	33,00 \pm 2,09 Aa
D-7	Inoculados	37,00 \pm 1,89Aa	3,17 \pm 0,98 Aa	27,00 \pm 1,41 Aa	32,83 \pm 1,26 Aa
D-14	Controle	34,00 \pm 2,09Aa	3,33 \pm 1,36 Aa	28,50 \pm 2,50 Aa	34,17 \pm 1,47 Aa
D-14	Inoculados	36,33 \pm 2,25Aa	2,67 \pm 1,50 Aa	27,67 \pm 2,07 Aa	33,33 \pm 1,63 Aa
D-21	Controle	35,33 \pm 2,16Aa	2,83 \pm 1,16 Aa	27,17 \pm 1,47 Aa	34,67 \pm 2,50 Aa
D-21	Inoculados	34,67 \pm 3,55Aa	3,33 \pm 1,63 Aa	28,00 \pm 2,82 Aa	34,00 \pm 2,28 Aa
D-28	Controle	35,00 \pm 2,58Aa	3,17 \pm 1,16 Aa	28,00 \pm 2,09 Aa	33,83 \pm 3,43 Aa
D-28	Inoculados	37,17 \pm 2,99Aa	2,83 \pm 2,13 Aa	26,66 \pm 2,16 Aa	33,33 \pm 2,58 Aa
D-35	Controle	36,50 \pm 2,88Aa	2,67 \pm 1,36 Aa	27,33 \pm 1,75 Aa	33,50 \pm 2,88 Aa
D-35	Inoculados	34,50 \pm 1,87Aa	3,00 \pm 1,41 Aa	28,83 \pm 1,16 Aa	33,67 \pm 2,13 Aa
D-42	Controle	34,17 \pm 3,55Aa	3,50 \pm 1,04 Aa	28,33 \pm 1,51 Aa	34,00 \pm 2,56 Aa
D-42	Inoculados	36,00 \pm 2,64Aa	3,33 \pm 1,21 Aa	27,50 \pm 2,25 Aa	33,17 \pm 2,92 Aa
D-49	Controle	35,83 \pm 2,48Aa	3,00 \pm 1,26 Aa	28,67 \pm 1,63 Aa	32,50 \pm 1,97 Aa
D-49	Inoculados	36,67 \pm 1,86Aa	2,83 \pm 1,16 Aa	27,83 \pm 1,47 Aa	32,67 \pm 3,32 Aa

* Nas colunas, letras maiúsculas e minúsculas distintas são para indicar semelhança estatística ($p \geq 0,05$), para cada parâmetro avaliado.

Em relação aos espermatozoides vivos sem reação acrossomal, os percentuais variaram de 34,00% \pm 2,09% a 36,50% \pm 2,88% entre os touros controle e de 34,50% \pm 1,87% a 37,17% \pm 2,99% entre os touros inoculados com BoHV-1. A análise feita entre os grupos e entre os dias de cada grupo não mostrou diferença estatística ($p \geq 0,05$).

Os espermatozoides vivos com reação acrossomal apresentaram percentuais que variaram entre 2,67% \pm 1,36% e 3,50% \pm 1,04% no grupo de touros controle e de 2,67% \pm 1,50% a 3,33% \pm 1,63% no grupo de touros inoculados. As médias encontradas nos dois grupos tiveram resultados semelhantes. Os dois grupos e os dias de cada grupo analisados apresentaram resultado estatisticamente similares ($p \geq 0,05$).

A análise dos grupos e dos dias, dos grupos de touros controle e inoculados com BoHV-1, referentes aos espermatozoides mortos sem e com reação acrossomal, indicou ausência de diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre todos os resultados encontrados.

Os índices percentuais de espermatozoides mortos sem reação acrossomal variaram de $27,00\% \pm 1,09\%$ a $28,67\% \pm 1,63\%$ e de $26,66\% \pm 2,16\%$ a $28,83\% \pm 1,16\%$ nas amostras dos respectivos grupos controle e inoculados com o BoHV-1. Já os percentuais de espermatozoides mortos com reação acrossomal variaram entre $32,50\% \pm 1,97\%$ e $34,67\% \pm 2,50\%$ nos touros do grupo controle e entre $32,67\% \pm 1,26\%$ e $34,00\% \pm 3,26\%$ no grupo de touros inoculados com BoHV-1. As médias dos dois grupos foram similares, porém com uma ligeira vantagem em percentuais para o grupo de animais inoculados com o BoHV-1. Os percentuais médios de acrossomos íntegros detectados no sêmen do grupo de touros inoculados variaram durante todo o experimento e possivelmente não foram associados à presença do BoHV-1, cujo material genético viral foi detectado nas amostras desses animais apenas nas primeiras semanas pi. Da mesma forma, SOUZA et al. (2011) não encontraram diferença estatística e possível interferência do BoHV-5 nos percentuais de espermatozoides vivos com reação acrossomal, que no referido estudo foi de $3,7\% \pm 1,2\%$ nas amostras de sêmen de touros expostos a esse vírus e de $3,3\% \pm 0,6\%$ nas amostras de sêmen de touros utilizados como controle. Nesse contexto, as alterações acrossomais nos espermatozoides podem ser visualizadas na Figura 5.

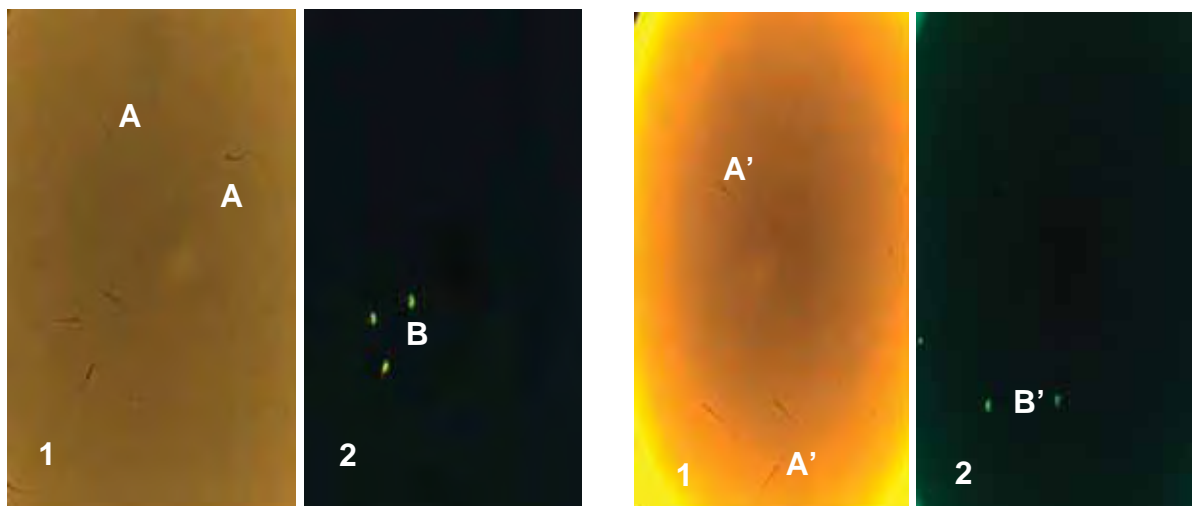


Figura 5. Fotografia em microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2) do mesmo campo de leitura. Espermatozoide vivo com acrossoma íntegro (A) do touro controle e (A') do touro inoculado com o BoHV-1 visualizado no contraste de fase (1) não se apresenta corado com a conjugação de FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim PNA e IP quando avaliado em epifluorescência (2). Espermatozoide morto com acrossoma reagido (B) do touro controle e (B') do touro inoculado visualizado no contraste de fase (1) apresenta-se corado com IP-PNA em epifluorescência (2) em aumento de 400x.

5.11 Exame Anátomo-histopatológico dos Testículos e Epidídimos

No exame histopatológico realizado setenta dias após a infecção experimental com o BoHV-1, os fragmentos de testículo das amostras de touros controles e inoculados não apresentaram alterações dignas de nota. Observou-se parênquima com epitélio estratificado, com as zonas basal, intermediária e superficial com aspecto normal, assim como as células: espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozoides, bem como as células de Sertoli e Leydig.

Os fragmentos do corpo do epidídimo das amostras de touros controles e inoculados também não apresentaram evidência de diferença histológica. Foi possível verificar epitélio pseudoestratificado cilíndrico, com estereocílios de aspecto normal, assim como a lâmina própria e a musculatura. Resultados histológicos semelhantes foram detectados por Whitmore et al. (1977), que também não observaram alterações histológicas relevantes nas análises dos fragmentos de testículos e epidídimos de touros inoculados com o BVDV. Já Kui et al. (1980) observaram, nos testículos analisados de quatro touros infectados pela bactéria *Brucella abortus*, extensa fibrose e degeneração de células epiteliais tubulares, com mais de 94% de comprometimento dos túbulos seminíferos, que apresentavam perdas de células germinativas primordiais e células de Sertoli. As células de Leydig apresentaram quantidades e estruturas normais. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores identificaram uma grave degeneração de células do epitélio tubular do corpo e da cauda dos epidídimos em um dos quatro touros analisados. Também com esse último agente, Adamu et al. (2007) observaram degeneração testicular, caracterizada pela depleção de células espermatogênicas e das células de Sertoli, a maioria das células de Leydig sofreram o processo de cariólise e destruição do tecido intersticial. Os epidídimos desse touro citado apresentaram comprometimento de mais de 60% do tecido intersticial, com o aparecimento de áreas focais de necrose.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho com inoculação experimental pelas vias respiratória e prepucial da estirpe Nebraska do BoHV-1 em touros jovens, foi possível concluir que:

- Todos os animais inoculados apresentaram manifestações clínicas características da infecção com forma e intensidade variável;
- A resposta sorológica determinou soroconversão no 14º dia PI, com título máximo de 512 entre os dias 35º e 42º PI, depois com tendência a queda;
- Foi possível identificar a presença do material genético do vírus no sêmen de todos os animais a partir de 7 dias PI, com persistência de 21 até 28 dias PI ;
- Não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo de touros controle e o grupo de touros inoculados em relação à qualidade do sêmen detectada por meio das análises do volume, da concentração, da motilidade, do vigor e dos defeitos espermáticos, assim como da integridade dos acrossomos e das membranas dos espermatozoides durante os 49 dias do experimento;
- A integridade histopatológica do epidídimo e do testículo não foi influenciada pela infecção experimental com o BoHV-1.

7 REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; BELAK, S.; BITSCH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G.; THIRY, E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-4, p. 361-363, 1990.
- ADAMU, S.; FATIHU, M. Y.; USEH, N.; MAMMAN, M.; SEKONI, V. O.; ESIEVO, K. A. N. Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, London, v. 143, n. 1, p. 29–34, 2007.
- AFFONSO, I. B.; AMORIL, J. G.; ALEXANDRINO, B.; BUZINARO, M. G.; MEDEIROS, A.S.R.; SAMARA, S. I. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) nas dez regiões de planejamento do Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 892-898, 2010.
- AFSHAR, A.; EAGLESOME, M. D. Viruses associated with bovine semen. **Veterinary Bulletin**, London, v. 60, n. 9, p. 689-697, 1990.
- ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and 5. **Journal Veterinary Medicine**, Berlim, v. 48, n. 8, p. 613-621, 2001.
- ALEXANDRINO, B. **Variação da ocorrência da rinotraqueíte infecciosa bovina pela associação com a diarreia viral bovina e a leucose enzoótica bovina**. 2008. 59 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C. Conseqüências da infecção pelo herpesvirus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. *Semina: - Ciências Agrárias*, Londrina, v. 19, n. 1, p. 86-93, 1998.
- ALFIERI, A. A. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR): epidemiologia, imunologia e profilaxia. **Atualização Técnica – Pfizer**, v. 46, p. 1-6, 2000.
- ALM, K. **Semen quality and fertility after artificial insemination in dairy cattle and pigs**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado) - University of Helsinki Finland, Helsinki, 2009.
- ALM, K.; KOSKINEN, E.; VAHTIALA, S.; ANDERSSON, M. Acute BRSV infection in young all bulls: effect on sperm quality. **Reproduction Domestic Animal**, Helsinki, v. 44, n. 3, p. 456-459, 2009
- ANCHIETA, M. C.; VALE-FILHO, V. R.; COLOSIMO, E.; SAMPAIO, I. B. M.; ANDRADE, V. J. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 196-204, 2005.

ANUNCIÇÃO, A. V. M.; LEITE, R. C.; MOREIRA, E. C.; REIS, R. Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro através da prova de hemoaglutinação passiva. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 5, p. 433-441, 1989.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; SOUZA, L. W. O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; GARCIA, A. R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 145-150, 2005.

ARRUDA, L. P.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; LEMOS, R. A. A.; NOGUEIRAS, A. P. A.; CRUZ, R. A. S.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M. Detecção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras de encéfalo conservadas em formol e embocadas em parafina provenientes de bovinos com doença neurológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 8, p. 646-650, 2010.

BANDYOPADHYAY, S.; CHAKRABORTY, D.; SARKAR, T.; PAL, B.; SASMAL, D.; BISWAS, T. K.; GHOSH, M. K.; SARKAR, M. A serological survey of antibodies against bovine herpesvirus-1 in yak (*Capra hircus*) in Arunachal Pradesh in India. **Revue scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v. 28, n. 3, p. 1045-1050, 2009.

BARBOSA, R. T.; ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F.; FONSECA, V. O. Comportamento sexual de touros das raças Canchim e Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 15, n. 3-4, p. 151- 157, 1991.

BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. E. D.; ALFAIAS, T. B. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1368-1373, 2005.

BATISTA, H. B. C. R.; SCHMIDT, E.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P. M. Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG, v. 62, n. 5, p. 1023-1028, 2010.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J. K.; AYERS, V. K.; SCHULTHEISS, P. C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, Amsterdam v. 31, n. 3, p. 358-365, 1994.

BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros da região Amazônica Maranhense. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 107-111, 2012.

BITSCH, V. Infectious bovine rhinotracheitis virus infection in bulls, with especial reference to preputial infection. **Applied Microbiology**, Washington, v. 26, n. 3, p. 337-343, 1973.

BIUK-RUDAN, N.; CVTENIC, S.; MADIC, J.; RUDAN, D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 5, p. 875 – 881, 1998.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordican Veterinær Medicin**, Kopenhagen, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.

BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J. P.; RASKIN, A.; DUFEY, J.; BERKVEN, D.; KERKHOFS, P. Prevalence of bovine herpesvirus1 in the Belgian cattle population. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam v. 45, n. 3-4, p. 285-295, 2000.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 40, de 30 de Junho de 2008**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2008.

BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. O.; CORTEZ, B. A.; MARQUES, L. M.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; ASSUMPTIÇÃO, M. E. O.; TIMENETSKY, J. Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozooids. **BioMed Central Research Notes**, Otherwise v. 4, p. 455, 2011.

CANTU, A.; ORTEGA, A. O.; MOSQUEDA, J.; VAZQUEZ, Z.; HENKE, S. E.; JHON, E. Prevalence of infectious agents in free-ranging white-tailed deer in Northeastern México. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 44, n. 4, p. 1002-1007, 2008.

CARBONERO, A.; SAA, L. R.; JARA, D. V.; ARENAS, A.; BORGE, C.; PEREA, A. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 23-53, 2011.

CARVALHO, J. O. N. **Avaliação da qualidade do espermatozóide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção in vitro de embriões**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

CASTRUCCI, G.; MARTIN, W.B.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; SALVATORI, D.; TAGLIATI, S.; CUTERI, V. A serological survey of bovine herpesvirus-1 infection in selected dairy herds in northern and central Italy. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 315-317, 1997.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 104, n. 4, p. 119-131, 2008.

CHANDRANAİK, B. M. Title: Isolation of BHV-1 from bovine semen and application of real time PCR for diagnosis of IBR/IPV from clinical samples. **Veterinarski Arhiv**, Zagreb, v. 80, n. 4, p. 467, 2010.

CIACCI-ZANELA, J.; STONE, M.; HERNDERSON, G.; JONES, C. The latency-related gene of bovine Herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. **The Journal of Virology**, Washington, v. 73, n. 12, p. 9734-9740, 1999.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2º Ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

COWLEY, D. J.; CLEGG, T. A.; DOHERTY, M. L.; MORE, S. J. Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 40, n. 3, p. 23-53, 2011.

DEL FAVA, C.; DE STEFANO, E.; PITUCO, E. M.; BILYNSKYJ, M. C. V.; OKUDA, L. H.; POZZI, C. R.; VERÍSSIMO, C. J.; DEMARCHI, J. J. A. A. Erradicação do herpesvirus bovino-1 (BHV-1) de um rebanho bovino leiteiro em manejo semi-intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 65-68, 1998.

D'OFFAY, J. M.; ELY R. W.; BALBWIN, C. A.; WHITENACK, D. L.; STAIR E. L.; COLLINS, J. K. Diagnosis of encephalitic herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine in tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 7, n. 2, p. 247-251, 1995.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

FARAH, A. A.; BUONAVOGLIA, D.; CAVALLI, A.; GIURATRABOCCHETTI, G.; PRESTERA, G. Antibodies to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in cattle in Potenza province. **Acta Medica Veterinária**, Nápoli, v. 40, n. 2, p. 113-116, 1994.

FARIA, B. O.; FRENEAU, G. E.; BRITO, W. M. E. D.; CAMPOS, J. A. C. P.; VIEIRA, S. Estudo de anticorpos contra o herpes vírus bovino tipo 1 em municípios do entorno de Goiânia, Go. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 543-545, 2003.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. Herpesviridae. In: _____. **Veterinary virology**. 2 ed. New York: Academic Press, 1993. p. 335-368.

FLORENT, G.; WISEMAN, A. An IgM specific ELISA for the serodiagnosis of viral bovine respiratory infections. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 4, p. 203-208, 1990.

FRANKEN, P. BVD (bovine virud diarrhea) and IBR (infectious bovine rhinotracheitis): serologic studies on 35 farms. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, Amsterdam, v. 111, n. 23, p. 1205-1207, 1986.

FREITAS-DELL' AQUA, C. P.; CRESPILO, A. M.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p. 213-222, 2009.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 160-170, 2011.

GALVÃO, A. **Avaliação da aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore, com infestação de *Dermatobia hominis* na bolsa escrotal**. 2009. 40 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

GALVÃO, C. L.; DORIA, J. D.; ALICE, F. J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v. 6, n. 6, p. 15-25, 1963.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrossomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in the Domestic Animal**, Helsinki v. 34, p. 399-404, 1999.

GATTI, S. P.; AFFONSO, I. B.; DIAS, F. C.; MEDEIROS, A. S. R.; FERREIRA, F.; SAMARA, S. I. Títulos de anticorpos anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) de bezerras em três rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, 147-152, 2010.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via sêmen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 3, p. 504-507, 2008.

GRAHAM, J. K, MOCÉ E. Fertility evaluation of frozen and thawed semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.

GUARINO, H.; NÚÑEZ, A.; REPISO, M. V.; GIL, A.; DAEGATZ, D. A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 15, n. 1-2, p. 34-40, 2008.

GUNGOR, A. B.; OZKUL, A. Dynamics of natural bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) infection in a dairy herd. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 39, n. 1, p. 12-20, 2007.

HENZEL, A. **Patogenia experimental da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1 em bezerras**. 2008. 43 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

HOCHSTEIN-MINTZEL, V.; RIEDE , S.; RE, T, G.; NIEDDA, M. Rinotraqueítis infecciosa bovina: relación entre títulos de anticuerpos y los índices reproductivos en un plantel lechero. **Journal of Veterinary Medicine**, Philadelphia, v. 33, n. 1-10, p. 697-703, 1986.

HOGG, A. A. UK bovine respiratory virus serosurvey (1991/92), London: British Cattle Veterinary Association, 1992. p. 347-352.

INTISAR, K. S.; ALI, Y. H.; KHALAFALLA, A. I.; MAHASIN, E. A.; AMIN, A.S. Natural exposure of dromedary camels in Sudan to infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpes virus-1). **Acta Trop**, Amsterdam, v. 111, n. 3, p. 243-6, 2009.

JUNQUEIRA, J. R. C. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 27, n. 3, p. 471- 480, 2006.

KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 171, n. 10, p. 1055-1064, 1997.

KAHRS, R. F., SMITH, R. S. Infectious bovine rhinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis, and abortion in a New York Dairy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 146, p. 217-220, 1965.

KAMPA, J.; ALENIUS, S.; EMANUELSON, U.; CHANLUN, A.; AJUMLAMAI, S. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in dairy herds: self clearance and the detection of seroconversions against a new atypical pestivirus. **Veterinary Journal**, Chicago, v. 182, n.2. p. 223-230, 2009.

KAPIL, S.; BASARABA, R. J. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia v. 13, n. 3, p. 455-469, 1997.

KRAHL, M.; BRAGA, A. C.; OLIVEIRA, L. G. P.; NETO, J. A. S.; PRADO, J. A. P.; ROSA, J. C. A.; JÚNIOR, W. Pesquisa de anticorpos para leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia virai bovina em soros bovinos de propriedades rurais do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1997, Gramado. **Anais...**p.174.

KRUGER, E. R.; KANTEC, C. E.; PINTO, M. A.; MEDINA, R. A Presence of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in dairy cattle in the Curitiba, PR, region. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 1991, Rio de Janeiro. **Anais...**p. 274.

KUI, J.; DIAKAO, I.; BALE, O. J.; OGWU, D.; OSORI, D. Effect of *Brucella abortus* infection on spermatogenesis three zebu bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 14, n. 3, p. 167-171, 1980.

LAMBERTO, P. Imunoprofilaxia da rinotraqueíte infecciosa bovina: vacinas com vírus atenuado, vacinas com vírus vivo termo-sensível e vacinas inativadas. In: SIMPÓSIO PFIZER, 2003, Goiânia. **Anais...** p. 16-21.

LATA, J.; KANAMI, A. N.; PATEL, T. J.; PUROHIT, J. H.; JHALA, M. K.; CHUAHAN, H. C.; CHANDEL. Seroprevalence of Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) in India breeding bulls of Gujarat. **Veterinary Science**, London, v. 22, n. 5, p. 253-256, 2008.

LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. Herpesvírus bovino tipol (BoHV1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968. p. 12 – 20.

MARCOPIDO, G.; PARREÑO. Antibodies to pathogenic livestock viruses in a wild vicuña (*Vicugna vicugna*) population in the Argentinean Andean altiplano. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 46, n. 2, p. 608-14, 2010.

MARS S. A.; OLSON, W.; NGUYEN, P. T.; PRIN, S.; DEREGT, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 60, n. 2, p. 100-107, 1996.

MARS, M. H.; JONG, M. C. M.; VAN MAANEN, C.; RAGE, J. J.; VAN OIRSCHOT, J. T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 1-13, 2000a.

MARS, M. H.; JONG, M. C. M.; FRANKEN, P.; VAN OIRSCHOT, J. T. A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. **Vaccine**, Kidlton v. 18, n. 19, p. 1975-1981, 2000b.

MARS, M. H.; JONG, M. C. M.; FRANKEN, P.; VAN OIRSCHOT, J. T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. **Vaccine**, Kidlton, v. 19, n. 15-16, p. 1924-1930, 2001.

MARTINS, J. A. M.; SOUZA, F. A.; FERREIRA, M. B. D.; GONÇALVES, P. E. M.; EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; LEITE, T. G.; GRAÇAS, D. S.; ANDRADE, V, J.; VALE FILHOS, V. R. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Gir selecionados para produção de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1277-1286, 2011.

MAZZIERO, R. R. D.; CRESPILO, A. M.; FREITAS- DELL` AQUA.; DELL`AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Análise de sêmen bovino e sua correlação com a fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte n. 6, p. 5-10, 2009.

MCGOWAN, A. C.; MURRAY, R. D. Health status of bulls used for natural breeding on farms in south west Scotland. **Journal Veterinary Medicine**, Philadelphia, v. 46, n. 5, p. 311-321, 1999.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Frequência em animais soropositivos para IBR em plantéis de bovinos leiteiros com problemas reprodutivos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1996, Goiânia. **Anais**. p. 112.

MEDINA, M. R.; VALLE, M. B.; ENGELS, M. E.; ACKERMANN, M. Molecular characterization of bovine herpesvirus 1 cuban strain. **Revista de Salud Animal**, Havana, v. 32, n. 1, p. 42-47, 2010.

MELO, C. B.; LOBATO, Z. I. P.; CAMARGO, M. F.; SOUZA, G. N.; MARTINS, N. R. S.; LEITE, R. C. Distribuição de anticorpos para herpesvirus bovino 1 em rebanhos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 575-580, 2002.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, Vienna, v. 146, n. 4, p. 633-652, 2001.

MILLER, J.M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 86, n. 1, p. 95-98, 1991.

MINEO, T. W.; ALENIUS, S.; NÅSLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJORKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 15, n. 4, p. 188-92, 2006.

MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-bases diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 145-153, July 2000.

MOTHA, M. X. J.; HANSEN, M. F. Prevalence of IBR, P13, BRS and BCV infections in the dairy cattle population of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 46, p. 239-240, 1998.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 38, n. 2, p. 181-209, 2007.

MWEENE, A. S.; FUKUSHI, H.; PANDEY, G. S.; SYAKALIMA, M. The prevalence of bovine herpesvirus-1 in traditional cattle in Southern Province, Zambia. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, Paris, v. 22, n. 3, p. 873-877, 2003.

NYLIN, B.; STROGER, U.; RONSHOLT, L. A retrospective evaluation of a bovine herpesvirus — 1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 91-105, 1999.

OBANDO, R. C.; HIDALGO, M.; MERZA M.; MONTOYA, A.; KLINGEBORN, B.; MORENO-LOPEZ, J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam v. 41, n. 4, p. 271-278, 2004.

OIE. Office Internatinal des Épizooties. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Healths_standards/tahm/2.04.13_IBR_IPV.pdf>. Acesso em: 08 de março de 2013.

OLIVEIRA, M. T.; CAMPOS, F. C.; DIAS, M.M.; VELHO, F. A.; FRENEAU, G. E.; BRITO, W. M. E. D.; RIJSEWIJK, F. A. M.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Detection of bovine herpesvírus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 75, p. 1139-1145, 2011.

PASSOS, T. S. **Avaliação da integridade da membrana plasmática e cromatina no sêmen bovino congelado.** 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.

PATON, D. J.; GOODEY, R.; BROCKMAN, S.; WOOD, L. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. **Veterinary Record**, London, n. 3, p. 63-64, 1989.

PESHEV, R.; CRISTOVA, L. Diagnostic and molecular epidemiological investigation of Bulgarian bovine herpes virus 1 strains by PCR and restriction enzyme analysis. **Revue de Medicine Veterinaire**, Paris v. 161, n. 8-9, p. 381-386, 2010.

PHILIPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, London, v. 149, n. 4, p. 339-369, 1993.

PITUCO, E.M.; STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; PARAVENTI, R.; COELHO, P. V.; BILYNSKYJ, M.C.V. Modelo alternativo para erradicação da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/ Vulvovaginite Infecciosa (IBRIIPV) em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 64, n. 17, p. 29, 1997

PUENTE, E. Impacto da IBR e da BVD na reprodução bovina. In: SIMPÓSIO PFIZER, 2003, Goiânia. **Anais...** p. 7-14.

QUEVEDO, D. C.; BENAVIDES, B.; CÁRDENAS, G.; HERRERA, C. Seroprevalence and risk factors associated to BHV-1 and DVBV in dairy herds in Pasto, Colombia, in 2011. **Revista Lasallista de Investigación**, Antioquia v. 8, n. 2, p. 101, 2011.

RAAPERI, K.; NURMOJA, I.; ORRO, T.; VILTROP, A. Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 74-81, 2010.

RAAPERI, K.; BOUGEARD, S.; ALEKSEJEV, A.; ORRO, T.; VILTROP, A. Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 30, n. 4, p. 54 – 58, 2012.

RAVAZOLLO, A.P.; DALLI, C.; PIZZOL, M.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o BoHV-1 em bovinos de alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v.17, p. 89 - 95, 1989.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REYNAUD, A.; DUGOUR, L.; PERRIN, B.; BERTIN, Y.; GIROUX, J. P.; SERRE, R. Detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by the EIE technique, in the Puy de Dome Department, in mixtures of serum or milk samples. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 171, n. 6, p. 451-456, 1995.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P. M.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 26, n. 2, p. 323-332, 1996.

ROCHA, M. A. Diagnóstico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, p. 535-539, 1999.

ROCHA, M. A.; BARBOSA, E. F.; GUIMARÃES, S. E. F.; GOUVEIA, A. M. G. A high sensitivity-nested PCR assay for BoHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 1-11, 1998.

ROCHA, M. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; BARBOSA, E. F.; LEITE, R. C. Herpsvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 373-380, 1999.

RODRIGUEZ, M.; SCHUDEL, A. A. Nucleic acid hybridisation and polymerase chain reaction in the diagnosis of infectious animal diseases. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 2, n. 2, p. 385-423, 1993.

ROSHTKHARI, F. Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. **Tropical Animal Health and Production**, Oxford v. 44, n. 5, p. 1105-1110, 2012.

RUSENOVA, I.; BOCHEY, I. C. Comparison of the seroprevalence against some respiratory viruses in mixed sheep-goat herds in two regions of Bulgaria. **Trakia Journal of Sciences**, Sofia, v. 7, n. 4, p. 58-62, 2009.

SANTOS, M. D.; PORTILHO, F. K. B. C.; RUAS, J. R. M.; FREITAS, S. H.; COSTA, D. S.; SIMÕES, M. J. Morfologia testicular e qualidade espermática de touros da raça Nelore, submetidos a dieta contendo gossipol. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 134-139, 2008.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpes viruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 17-29, 1996.

SEKONI, V. O.; REKWOT, P. I.; BAWA, E. K. Effects of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections on the reaction time and semen characteristics of Zebu (Bunaji) _ Friesian crossbred bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 1, p. 55-62, 2004.

SENGER, P. L. Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. In: MORROW, D. A. (Itda). **Current Therapy in Theriogenology**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 162-174.

SILVA, M. S. **Identificação molecular de herpesvírus bovino tipos 1 e 5**. 2009. 69 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M.A.N. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidade e fatores que a influenciam**. Campo Grande: Embrapa - CNPGC, 1993. p. 78-108. (Documento, 51).

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 5, p. 958-978, 2006.

SILVA, L. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo-1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1471-1474, 2007.

SILVA, F. F.; CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H.; ABREU, S. R. O.; MUNIZ, A. M. M. Anticorpos neutralizantes contra BoHV-1, em bovinos do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 47, n. 4, p. 597-599, 1995.

SILVA, M. S.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Belo Horizonte, v. 27, n. 10, p. 403-408, 2007.

SMITHS, C. B.; VAN MAANEN, C.; GLAS, R. D.; DE GEE, A. L. W.; DIJKSTRAB, T.; VAN OIRSCHOT, J. T.; RIJSEWIJK, F. A. M. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. **Journal of Virology**, Washington, v. 85, n. 12, p. 65-73, 2000.

SOLIS-CALDERON, J. J.; CORREA, V. M. S.; CORREA, J. C.; HERRERA, C. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 3-4, p. 253-262, 2005.

SOUZA, D. G.; SILVA-FRADEA, C. M.; JUNIOR, A.; CARDOSO, T. C. Bull semen variables after experimental exposure with bovine herpesvirus type 5. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 1-2, p. 55-60, 2011.

STRAUB, O. C. BHV1 infections: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

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

TEIXEIRA, M. F. B. **Um ensaio imunoenzimático com anticorpo monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpes vírus bovino tipo 1 (BHV-1)**. 1998. 56f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

TEKES, L.; MAKROS, B.; KECSKEMETI, S.; MEHESFALVI, J.; MATÉ, Z.; KUDRON, E. Prevalence of bovine herpesvirus 1(BHV1) infection in Hungarian cattle herds. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 47, n. 3, p. 301-309, 1999.

TIKOO, S .K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 45, p.191-223, 1995.

TRANGADIA, B.; RANA, S. K.; MUKHERJEE, F.; SRINIVASAN, V. A. Prevalence of brucellosis and infectious bovine rhinotracheitis in organized dairy farms in India. **Tropical Animal Health Production**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 203-207, 2010.

VAN DONKERSGOED, J.; BABIUK, L.A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 86, n. 1, p. 86-94, 1991.

VAN ENGELENBURG, F. A. C.; VANSCHIE, F. W.; RIJSEWIJK, F. A. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 2, p. 308-301, 1995.

VAN OIRSCHOT, J. T. Bovine herpesvirus in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 29-33, 1995.

VAN OIRSCHOT, J. T. The BoHV-1 situation in Europe. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPOS 1 E 5) E VIRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...**p. 69-72.

VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK F. A. M.; WEERDMEESTER, K. Advances in development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 43-54, 1996.

VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; MARIS-VELDHUIS, M. A.; WEERDMEESTER, K.; RIJSEWIJK, F. A. M. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **Journal of Virology**, Washington v. 67, n.1, p. 23-34, 1997.

VAN SCHAİK, G.; DIJKHUIZEN, A. A.; HUIRNE, R. B. M.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; HAGE, J. J. Risk factors for existence of bovine herpesvirus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 34, n. 3-2, p. 125-136, 1998.

VAN SCHAİK, G.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A. A.; BARKEMA, H. W.; DENEDICTUS, G. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 279-289, 2002.

VIEIRA, S.; BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; ALFAIA, B. T.; LINHARES, D. C. L. L. Anticorpos para o Herpesvírus Bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 131-137, 2003.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MORAES, M. P.; BRAGANÇA, J. F. M. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 3-4, p. 185-196, 2004.

WALDNER, C. L. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 90, n. 3-4, p. 219-242, 2005.

WELLENBERG, G. J.; MARS, M. H.; VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 79-84, 2001.

WENTINK, G. H.; VAN OIRSCHOT, J. T.; VERHOEFF, J.; MARS, M. H. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV1): a review. **Veterinary Quartely**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 3033, 1993.

WHITMORE, H. L.; GUSTAFSSON, B. K.; HAVARESHTI, P.; DUCHATEAU, A. B.; MATHER, E. C. Inoculation of bulls with bovine virus diarrhoea virus: excretion of virus in semen and effects on semen quality. **Theriogenology**, Stoneham, v. 9, n. 2, p.153-163, 1977.

WINKLER, M. T. C.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 11, p. 5337-5346, 2000.

YANG, D. K.; HWANG, I. J.; KIM, B. H.; KWEON, C. H.; LEE, K. W.; KANG, M. I.; LEE, C. S.; CHO, K. O. Serosurveillance of viral diseases in Korean native goats (*Capra hircus*). **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo v. 70, n. 9, p. 977-979, 2008.

YESILBAG, K.; GUNGOR, B. Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. **Tropical Animal Health Production**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 55-60, 2008.