UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

ATUAÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA VIA REPRODUTIVA DE MACHOS SUÍNOS

Gabriel Yuri Storino

Médico Veterinário

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

ATUAÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA VIA REPRODUTIVA DE MACHOS SUÍNOS

Gabriel Yuri Storino

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área: Clínica Médica Veterinária

2018

S884a

Storino, Gabriel Yuri
Atuação do vírus da diarreia viral bovina na via reprodutiva de machos suínos / Gabriel Yuri Storino. -- Jaboticabal, 2018
40 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Luis Guilherme de Oliveira
Coorientadora: Maria Emília Franco Oliveira

1. Inseminação artificial. 2. Pestivirus. 3. Qualidade seminal. 4. Sêmen. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ATUAÇÃO DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA NA VIA REPRODUTIVA DE MACHOS SUÍNOS

AUTOR: GABRIEL YURI STORINO
ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA
COORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ANDRÉ FURUGEN CÉSAR DE ANDRADE
Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP / Pirassununga/SP

Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 13 de dezembro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIEL YURI STORINO – Nascido em 22 de Fevereiro de 1994, na cidade de Porto Ferreira, Estado de São Paulo, é Médico Veterinário formado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – em 2016. Foi bolsista PROPe de Iniciação Científica (2014-2015) no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP, Câmpus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. Em 2017, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista FAPESP, com o número de processo 2017/00950-0, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. O projeto obteve auxílio FAPESP, com o número de processo 2016/21421-2.

“Entregue o seu caminho ao Senhor; confie nele, e ele agirá.”

Salmos 37:5

À Deus, por todas as graças recebidas. À minha namorada e à minha família, por todo apoio para que essa conquista fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por agir de forma sobrenatural para que tudo acontecesse e fosse possível chegar até aqui e por preparar grandes coisas na minha trajetória de vida.

Aos meus Pais, Flávio e Carla por toda minha estrutura moral e pessoal, pelo apoio incondicional para todas as horas e pela ajuda em todos os momentos durante toda a minha vida. Agradeço a minha namorada Maria Alice, por sempre ter estado ao meu lado, pelo apoio de todas as horas e por ser sempre solícita e amável me ajudando a enfrentar as diversas dificuldades ao longo do trajeto percorrido durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira que sempre desempenhou de forma impar seu papel como orientador. Agradeço pelo apoio e amizade que começaram na iniciação científica, que tem sido de grande importância para meu desenvolvimento profissional durante o mestrado.

À Profa. Dra Maria Emília pela orientação, ensinamentos e auxílios prestados para que se tornasse possível a realização desse trabalho.

À República In-dependência e a todos os amigos que fiz lá, por todo o apoio, parceria e amizade nesses anos de convívio.

A Eduarda Xavier e ao Artur Simonatto pela ajuda na condução deste trabalho em conjunto, pela colaboração e auxílio em todas as etapas; à Marina, pela amizade e por auxiliar sempre de forma bastante solícita, por ajudar e acompanhar as diversas etapas do meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Suínos, pela amizade e apoio, aos demais estagiários que eventualmente me auxiliaram no dia-a-dia com os animais. Muito obrigado!

Ao Laboratório de Viroses da Reprodução, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, ao Igor e à Andrea, pelo auxílio prestado para a execução dos testes de virusneutralização.

Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo espaço cedido para a realização das análises

moleculares. Ao Laboratório de Patologia Veterinária da FCAV, por me ceder espaço para a confecção dos blocos e lâminas histológicas.

Ao Dr. Paulo Alécio Canola e aos Médicos Veterinários residentes em Cirurgia Cirúrgica de Grandes Animais: Ana Luiza, Carolina, Gabriel, Lucas, Mayara e Pedro Henrique pelos auxílios prestados com os procedimentos de orquiectomia dos machos suínos.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial a Dra. Edviges Maristela Pituco por nos ceder o inóculo utilizado neste experimento e auxiliar com diversos diagnósticos moleculares e sorológicos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal e ao Arildo “Baiano”, que me ajudou com carregamento de ração e transporte de animais.

À Gisele Mouro e ao Prof. André Andrade pelo espaço e tempo cedidos para o treinamento com cachaços reprodutores na USP, campus de Pirassununga.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos processo número 2017/00950-0, e auxílio à pesquisa (2016/21421-2) que possibilitaram o desenvolvimento do projeto de pesquisa finalizado nessa dissertação.

SUMÁRIO

Página

Certificado Comissão de Ética para Experimentação Animal xi
RESUMO xii
ABSTRACT xii
LISTA DE TABELAS xiv
LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS..... xv
CAPÍTULO I – Considerações gerais..... 1
1 INTRODUÇÃO..... 1
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 2
2.1 Diarreia Viral Bovina..... 3
2.2.Aspectos ligados à reprodução de suínos e os riscos associados..... 6
3 REFERÊNCIAS..... 7
CAPÍTULO II – Ausência de efeitos do Vírus da Diarreia Viral Bovina na via reprodutiva de cachaços inoculados experimentalmente.... 12
RESUMO..... 12
1 INTRODUÇÃO 14
2 MATERIAL E MÉTODOS 15
2.1 O Inóculo..... 15
2.2 Experimento I – Infecção experimental com BVDV- 2 ncp e avaliação dos efeitos reprodutivos em cachaços..... 15
2.2.1 Inoculação experimental..... 16
2.2.1 Metodologia de colheita..... 16
2.2.3 Análises seminais..... 18
2.2.4 Analise anatomopatológica dos testículos..... 19
2.3 Experimento II – Mimetização da transmissão de BVDV-2 ncp via inseminação artificial..... 20
2.3.1 Inseminação..... 20
2.3.2 Colheita de amostras e acompanhamento da gestação..... 20
2.4 Teste de virusneutralização..... 21
2.5 RT - PCR..... 21
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 22

4 RESULTADOS..... 22
4.1 Sinais clínicos..... 22
4.2 Parâmetros seminais..... 22
4.3 Antomopatologia testicular 23
4.4 Análises hematológicas..... 23
4.5 Virusneutralização..... 24
4.6 RT-PCR..... 24
5 DISCUSSÃO..... 25
6 CONCLUSÃO..... 28
7 AGRADECIMENTOS..... 28
8 FINANCIAMENTO..... 28
9 CONFLITO DE INTERESSES..... 29
10 DECLARAÇÃO DE INTERESSE..... 29
11 REFERÊNCIAS..... 29
APÊNDICES..... 35

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **"Atuação do vírus da Diarréia Viral Bovina na via reprodutiva de machos suínos"**, protocolo nº 19.242/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de dezembro de 2016.

Vigência do Projeto	02/03/2017 a 28/02/2019
Espécie / Linhagem	Suínos
Nº de animais	16
Peso / Idade	120 kg
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Granjas Comerciais dos estados de São Paulo e Minas Gerais

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2016.

Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

ATUAÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA VIA REPRODUTIVA DE MACHOS SUÍNOS

RESUMO – Infecções causadas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina em suínos podem resultar em leucopenia transiente, gastroenterite crônica, septicemia, e lesões hemorragicas. Tanto o vírus da Peste Suína Clássica (PSC) quando do Peste Vírus Atípico (APPV) são excretados no sêmen de cachaços infectados. Por compartilharem de regiões conservadas e apresentarem similaridade antigênica, é possível que não sejam as únicas espécies pertencentes ao gênero Pestivirus que possam ser excretadas no sêmen de suínos infectados. Em um primeiro momento, foram selecionados seis machos treinados para colheita de sêmen em manequim, dos quais foram colhidas amostras de sangue, sêmen e suabe prepucial a cada quatro dias até o 52º dia pós-inoculação com BVDV-2. Posteriormente, oito fêmeas foram adquiridas e alocadas em dois grupos: o grupo controle (n=2) e o grupo inseminado com sêmen contaminado com BVDV-2 (n=6) em laboratório, com o objetivo de mimetizar a transmissão do BVDV-2 via inseminação artificial. As amostras de sangue dos machos e das fêmeas, sêmen e suabe preprucial colhidos, foram testadas para a detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR. Uma alíquota de sangue total dos cachaços foi utilizada para realização de análises hematológicas, as quais mostraram redução significativa na contagem de monócitos e aumento significativo na contagem de linfócitos quando comparados os períodos pré e pós-inoculação com BVDV-2. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram determinados por virusneutralização. Nenhum dos animais apresentou sinais clínicos e não foi observada excreção do BVDV-2 na via reprodutiva ou piora nos parâmetros seminais avaliados. A transmissão de BVDV-2 via inseminação artificial sob condições experimentais não foi observada.

Palavras – Chave: Inseminação artificial, Pestivirus, qualidade seminal, sêmen

THE ROLE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF BOARS

ABSTRACT – The Bovine Viral Diarrhea Virus infection in pigs can result in transient leukopenia, chronic gastroenteritis, septicemia, and hemorrhagic lesions. Both the Classical Swine Fever Virus (CSF) and the Atypical Porcine Pestvirus (APPV) are shedding in semen of infected boars. Because they share conserved regions and present antigenic similarity, they may not be the only species belonging to the genus Pestivirus that can be shed in the semen of infected boars. At first, six trained males were selected for semen collection on a dummy. From those animals were collected blood, semen and preputial swab every four days until the 52nd day after inoculation with BVDV-2. Posteriorly, eight females were acquired and allocated to two groups: the control group (n = 2) and the inseminated group with BVDV-2 contaminated semen (n = 6), aiming to mimic BVDV-2 transmission by artificial insemination. Blood samples from males and females, semen and preputial swab collected, were tested for viral RNA detection by the RT-PCR technique. An aliquot of whole blood from the boars was used to perform hematological analyzes, which showed a significant reduction in monocyte counts and a significant increase in lymphocyte count when comparing periods before and after inoculation with BVDV-2. Neutralizing antibody titers were determined by virus neutralization. None of the animals presented clinical signs and no BVDV-2 shed was observed in the reproductive route nor worsening in the seminal parameters evaluated. Transmission of BVDV-2 via artificial insemination under experimental conditions was not observed.

Key words: Artificial insemination, Pestivirus, seminal quality, semen

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Valores das variáveis seminais nos períodos, pré e pós – inoculação, de cachaços submetidos à inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0 do Experimento I (Mediana ± erro padrão da mediana). Jaboticabal, SP, 2017 – 2018..... 36

Tabela 2. Valores dos parâmetros hematológicos nos períodos pré e pós – inoculação de cachaços submetidos à inoculação experimental do BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0 do Experimento I (Mediana ± erro padrão da mediana)..... 37

Tabela 3. Títulos de anticorpos neutralizantes detectados, pela técnica de virusneutralização, no soro sanguíneo dos cachaços inoculados experimentalmente com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) ao longo do período do Experimento I, de D-16 a D44. Jaboticabal, SP, 2017 -2018..... 38

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Página

Fígura 1. Representação esquemática da metodologia experimental adotada no Experimento I, com destaque ao momento (Dia 0) da inoculação experimental do BVDV- 2 não-citopático (estirpe LVB 16557/15) em cachaços, pelas vias oral, nasal, intramuscular e intravenosa, e momentos de colheitas de amostras seminais, de sangue e suabe prepucial..... 37

Gráfico 1. Porcentagens (mediana ± erro padrão da mediana) de defeitos totais das células espermáticas de cachaços submetidos à inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman (p< 0,05). Jaboticabal, SP, 2017 – 2018..... 39

Gráfico 2. Valores (mediana ± erro padrão da mediana) de contagens linfócitos por µL de sangue de cachaços submetidos à inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman (p< 0,05). Jaboticabal, SP, 2017 – 2018..... 39

Gráfico 3. Valores (mediana ± erro padrão da mediana) de contagem de monócitos por µL de sangue de cachaços submetidos a inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman (p< 0,05)..... 40

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A detecção de diferentes espécies de vírus no sêmen de suínos tem sido evidenciada por diversos pesquisadores e alertam para a possibilidade de transmissão de agentes de grande importância e que causam impacto na produção animal no mundo todo. São exemplos desses agentes: os vírus causadores da doença de Aujesky (Medveczky et al., 1981), da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (Shin et al., 1997; Christopher-Hennings et al., 1995), do Circovirus tipo-II (Madson et al., 2009; Kim et al., 2001; Hamel et al., 2000). Colocando em evidência a importância de monitorar tais patógenos e muitos outros, que possam utilizar deste meio para sua disseminação.

A Peste Suína Clássica (PSC), pertencente ao gênero Pestivirus foi detectada sêmen de cachaços infectados e teve sua transmissão confirmada por meio da inseminação artificial (De Smit et al., 1999). O macho infectado por peste suína clássica, em condições experimentais, excreta o vírus no sêmen por um período superior a 50 dias, após a inoculação (Choi et al., 2003)

Recentemente, outra espécie pertencente ao gênero Pestivírus, o Pestivírus Atípico Suíno (APPV) foi identificado no sêmen e fluídos prepruciais de machos suínos infectados de forma natural, provenientes de uma unidade comercial de produção de sêmen (Gatto, 2017). O APPV tem se mostrado importante do ponto de vista reprodutivo, pois vem sendo associado ao nascimento de leitões com tremor congênito em episódio de ocorrência a campo e também em condições e experimentais após inoculação do agente em fêmeas e em fetos (Arruda, 2016).

Atualmente existem poucos relatos a respeito da ação de outras espécies de Pestivirus em suínos, principalmente do ponto de vista da reprodução e dos efeitos da infecção na potencial reprodutivo dos machos. Não existem estudos avaliando a excreção nem a transmissão via sêmen do BVDV em suíno, assim como é relatado para a espécie Bovina. (Kirkland et al. 1991).

2. Revisão de literatura

2.1. Diarreia Viral Bovina

A diarréia viral bovina (BVD) é uma enfermidade causada pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), pertence ao gênero Pestivirus, família flavivirídae e possui RNA de fita simples, de orientação positiva (King, 2011). O BVDV possui dois genótipos, o BVDV tipo I e o BVDV tipo II que por sua vez são classificados em citopático e não-citopático de acordo com os efeitos sobre culturas celulares em vitro. (Becher; 2011; Tauz, 2015; Simmonds, 2017). O genótipo de BVDV-1 possui pelo menos 21 subgenótipos (1a- 1u) enquanto o BVDV-2, quatro (2ª – 2d) (Yeşilbağ, 2017).

Até recentemente eram reconhecidas como espécies pertencentes ao gênero pestivirus, o Vírus da Peste Suína Clássica (CSFV), o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV-I e BVDV-II), o Vírus da Doença da Fronteira de Ovinos (BDV) (Becher et al., 2003) e o Vírus Bungowannah (Kirkland et al., 2007) que foi isolado de suínos com casos de miocardite (Finlaison et al., 2009). Novas espécies de Pestivirus foram descobertas nos últimos anos, dentre eles o Pestivirus atípicos associados ao Tremor Congênito em Suínos (Arruda et al., 2016; Postel et al., 2016) e o “Hobilike” (Ståhl et al., 2010). Atualmente, também são classificadas como espécies do gênero Pestivirus, o Pronghorn Antelope Pestivirus, o Giraffe pestivirus, o Hobi-like pestivirus, o Aydin-like Pestivirus, o Rat Pestivirus e o Atypical Porcine Pestivirus (Simmonds, 2017).

Os Pestivirus apresentam a característica de infectar hospedeiros de diferentes espécies e reúne agentes virais de grande importância devido ao impacto econômico que causam à produção animal (Moenning, 1995; Hooe, 2003; Lanyon, 2013). O primeiro relato de doença causada por um Pestivirus data do início do século XIX, em meados dos anos 1830 com um caso descrito de Peste Suína Clássica. A primeira detecção relatada do BVDV em suínos foi no ano de 1973, agente que já vinha sendo descrito como agente patogênico para ruminantes desde os anos 40 (Tautz et al 2015; Fernelius, et. al., 1973).

É relatado que o genótipo BVDV -1b esta relacionado com ocorrências naturais da doença em rebanhos bovinos, na maioria dos casos e é relatado como o

mais prevalente nos países europeus (Yeşilbağ et al, 2017). No Brasil, um levantamento realizado em rebanhos bovinos entre os anos de 2004 e 2014, registrou as prevalências dos genótipos e subgenótipos sendo a maior prevalência do BVDV-Ia seguido do BVDV-IIb, e alem desses outros subgenótipos: 1a, 1b, 1d, 1e e 2c, o que demonstra uma extensa variabilidade genética das espécies no pais (Silveira et al, 2017). Existem poucos estudos com de prevalência de BVDV em rebanhos suínos. Um estudo de detecção de anticorpos em rebanhos suínos no estado de São Paulo detectou maior prevalência de anticorpos específicos para BVDV-II (3.06%) (Almeida et al., 2018).

Existe similaridade na manifestação clínica da doença causada por ambos os genótipos, que esta associada com à virulência da estirpe dentro de cada genótipo. O genótipo BVDV-II é descrito como mais virulento, porém existe um espectro de variação de virulência entre as estirpes (Brodersen, 2014). Os sinais clínicos podem variar, desde a ausência de sinais clínicos, ocorrência de sinais clínicos leves, até quadros graves que podem levar o animal à morte. Tal variação de virulência é relatada tanto para o BVDV-I quanto para o BVDV-II (Gethmann et al, 2015).

Em bovinos, o BVDV é capaz de infectar vários tipos celulares, replicando em diferentes órgãos e têm predileção por células do sistema imune como monócitos, linfócitos, macrófagos e células dendríticas, afetando principalmente tecidos linfóides associados (Ohmann, 1983). A infecção pelo BVDV na espécie bovina promove a destruição das células de defesa modulando a imunidade celular e por conseqüência a imunidade humoral, como estratégia para a manutenção do agente no organismo e indiretamente possibilitando que outros microorganismos infectem o indivíduo imunossuprimido (Brodersen, 2014; Ridpath, 2012; Brownlie, 1990).

A interação do vírus com o sistema imune se inicia pela sua ligação com as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, monócitos e macrófagos), por meio de receptores de reconhecimento de patógenos (RRP). Os RRP estão presentes tanto na membrana (“toll-like” e “C-type lecitin”), quanto no ambiente intracitoplasmático (“nod-like” e “RG-1 like”), os quais possuem a função de reconhecer às diversas estruturas externas que compõe diferentes microorganismos invasores (Chase, 2013). Os vírus reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos ativam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, são fagocitados e

reduzidos a peptídeos, que por sua vez são apresentados aos linfócitos. A extensa replicação do BVDV cp implica na lise de monócitos enquanto efeitos das estirpes ncp sobre as células apresentadoras de antígenos ainda não foi completamente esclarecido (Chase, 2013).

É relatado, que bovinos infectados por BVDV apresentam rarefação linfóide em tecidos linfóides, com marcada depleção das células de defesa que compõe órgãos como baço, timo, e placas de peyer (Brodersen, 2014). O BVDV afeta o sistema gastrointestinal e respiratório, o que se caracteriza pela ocorrência de diarréia, alterações respiratórias, erosões na mucosa oral, laringe, faringe, esôfagos, ocasionalmente as lesões podem ser hemorrágicas.(Flores et al, 2000; Gethmann et al, 2015; Bianchi, 2016). Afeta também o sistema reprodutivo de machos e fêmeas promovendo efeitos negativos sobre a performance reprodutiva desses animais (Givens, 2015; Brodersen, 2014; Moening e Leiss, 1995). As lesões de mucosa são características presentes em animais infectados de forma aguda com estirpes citopáticas, e o conjunto de sinais clínicos são chamados de doenças das mucosas (MD) (Brodersen, 2014).

O BVDV pode ser transmitido por contato direto ou indireto entre os animais. É descrito na espécie bovina, que a excreção viral pode ocorrer através de secreções nasais, oculares, genitais, orais, leite, urina, fezes e sêmen. (Thurmond, 2005). Em bovinos, experimentalmente foi constatado que a ocorrência de sinais clínicos severos, bem como a ocorrência de viremia e o período de excreção do vírus em animais infectados de forma aguda, aumentam quando o organismo se encontra imunossuprimido no momento do contágio e quando são administradas doses infectantes com elevado número de cópias vírais, demonstrando relação dose-resposta (Strong et al. 2015).

A transmissão vertical aos embriões e fetos é uma consequência frequente em vacas prenhes (Thurmond, 2005). As infecções por BVDV em suínos não resultam em sinais clínicos, fêmeas inoculadas experimentalmente com o Vírus da Diarréia Viral Bovina demonstraram ausência de transmissão transplacentária (Mechler, 2018). A infecção de bovinos pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina resulta em modulação da resposta imune inata e quando ocorre durante o período da gestação, o vírus atravessa a barreira placentária e é transmitido de forma vertical

aos fetos. Os fetos infectados podem nascer em uma condição chamada de persistentemente infectado (PI). (Deregt e Loewen, 1995). Em bovinos, quando há infecção por uma estirpe ncp de BVDV-1 ou BVDV-2 até o 120º dia de gestação, período que antecede o pleno desenvolvimento do sistema imune do feto, o vírus se mantém no indivíduo sem ser reconhecido como uma ameaça pelo sistema imune, resultando em indivíduos PI. Indivíduos PI, após o nascimento, serão a principal fonte de infecção para outros animais suscetíveis, mantendo o vírus circulante no rebanho (Grooms, 2004; Baker, 1995).

Em suínos, o vírus parece não atuar de forma análoga ao que ocorre para a espécie bovina, não tendo sido evidenciado o nascimento de animais PI, proveniente de porcas inoculadas durante a gestação em um período anterior ao completo desenvolvimento do sistema imune dos fetos, o que sugere que o vírus não é transmitido para o feto através da placenta (Gomes et al. 2018).

Na espécie bovina infecções por diversos patógenos têm sido disseminadas devido ao uso de técnicas reprodutivas, não se atentando aos pontos críticos de controle sanitário. A transferência de embrião e inseminação artificial com sêmen contaminado ou proveniente de animais infectados têm se tornado pontos importantes na epidemiologia da infecção de diversos agentes patogênicos (Gard et al., 2007).

Bovinos persistentemente infectados excretam BVDV em alta quantidade no sêmen (107.6 CCID50/ mL). Podendo ser detectada em até 20 dias após a infecção experimental e permanecendo viável no sêmen mesmo após o processamento e congelamento (Kirkland et al. ;1991). A capacidade de transmissão de BVDV via sêmen em bovinos foi avaliada resultando na infecção de fêmeas através da inseminação artificial (Kirkland et al. 1997).

Os PI são considerados como principal fonte de disseminação e por conseqüência, de transmissão para os demais animais, e por esse motivo devem ser identificados e eliminados, sendo essa, a medida mais importante para o controle da diarréia viral bovina. A orientação dos produtores e colaboradores em propriedades de produção animal com relação aos efeitos negativos da diarréia viral bovina nos rebanhos é um dos fatores primordiais para a criação e execução de planos de controle eficazes, com aplicação medidas de biossegurança internas e externas,

ressaltado a importância do monitoramento do agente e do perfil sorológico dos animais (Givens, 2015).

2.2. Aspectos ligados à reprodução de suínos e os riscos associados

A inseminação artificial é a uma biotecnica reprodutiva que se faz preponderante na produção em granjas tecnificadas e promove ganhos genéticos, aumento da produtividade estimulando a máxima eficiência dos reprodutores.

O processo de produção de doses inseminantes a partir do ejaculado do macho reprodutor marca um dos maiores avanços tecnológicos na produção de suínos. De um único ejaculado é possível obter diversas doses inseminantes a depender da concentração espermática (Watson e Behan, 2002). Com a diluição seminal é possível maximizar o aproveitamento da genética do macho reprodutor. Diferentemente da monta natural, com um ejaculado é possível cobrir até 20 fêmeas por meio da inseminação (CBRA, 2013).

De um único cachaço ao longo de sua vida, são produzidas doses inseminantes para um número quase ilimitado de fêmeas reprodutoras, o que é de grande importância do ponto de vista econômico e produtivo, porém requer atenção para os impactos desta prática do ponto de vista sanitário, já que existem inúmeros riscos atribuídos (Althouse, 2000).

A viabilidade seminal pode ser atestada com o uso de diversas técnicas, que avaliam o material genético e garantem de forma precisa a eficiência reprodutiva do cachaço. A partir do sêmen fresco é possível avaliar parâmetros qualitativos como a cor e o odor, e parâmetros quantitativos como a motilidade espermática, vigor, aglutinação, integridade de membrana e defeitos morfológicos (CBRA, 2013). A análise dos parâmetros seminais se faz um pré-requisito em centrais de inseminação e deve ser feita com periodicidade, de maneira a monitorar o status reprodutivo e sanitário do rebanho e deve estar em consonância com as boas práticas de coleta, de avaliação, de armazenamento e expedição do sêmen (Maes, 2016).

Parâmetros seminais são importantes do ponto de vista reprodutivo pois indicam a qualidade do sêmen utilizado, que em casos de má qualidade afetam negativamente a reprodução como um todo (Juonala et al., 1998). Aspectos reprodutivos como o número de nascidos vivos e o tamanho da leitegada são

exemplos de variáveis reprodutivas de fêmeas que comprovadamente podem ser ocasionados pela utilização de sêmen de baixa qualidade. (Mc Pherson, 2014).

A avaliação rotineira do ejaculado e da viabilidade seminal, é importante também para monitorar o status sanitário do rebanho. As práticas de coleta, avaliação e produção de doses inseminantes, bem como os manejos reprodutivos que são feitos nas centrais de inseminação são pontos críticos e que estão relacionadas diretamente com a qualidade do sêmen. Com relação ao aspecto sanitário propriamente dito, o sêmen esta sujeito a contaminação de fontes do ambiente, em qualquer uma das fases, da coleta até a comercialização das doses inseminantes (Goldberg et al., 2009).

Existem estratégias para o controle e prevenção da ocorrência e de transmissão de agente patogênicos via inseminação no plantel de suínos, e são baseadas em programas de biossegurança, que devem estar presentes em todas as fases e sítios de produção. Nas centrais de inseminação, deve-se ter atenção aos pontos críticos, estabelecer procedimentos operacionais que oriente os colaboradores, além de realizar com freqüência levantamentos sanitários, monitoramento do status do rebanho, acompanhado das avaliações reprodutivas periódicas. É necessária a capacitação dos profissionais que trabalham nas centrais, para que sejam seguidos procedimentos estabelecidos com atenção a higiene, as boas práticas de coleta, avaliação e confecção das doses inseminantes.

3. REFERÊNCIAS

Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM (2000) Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology** 53(5):1167-1176.

Arruda, B. L, Arruda P. H, Magstadt DR, Schwartz KJ, Dohlman T, Schleining JA, Victoria JG (2016) Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. **PLoSOne** 11(2), e0150104. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150104

Becher P, Tautz N (2011) RNA recombination in pestiviruses: cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. **RNA biology** 8(2):216-224. https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14514.

Brodersen, BW (2014) Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control (2014) **Veterinary Pathology**. 51(2):453-464. https://doi.org/10.1177/0300985813520250.

Brownlie J (2010) The pathogenesis of bovine virus. **Radiol Technol, Radiologic Technology** 9:43-59.

Colégio Brasileiro De Reprodução Animal – CBRA (2013) Manual para exame e avaliação de sêmen animal 3ªed., Belo Horizonte : CBRA

Chase, C. C (2013) The impact of BVDV infection on adaptive immunity **Biologicals** 41(1):52-60. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.009

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Christopher CL, Yaeger MJ, Benfield DA (1995) Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation** 7(4):456-464.

Choi C, Chae C. Detection of classical swine fever virus in boar semen by reverse transcription–polymerase chain reaction (2003) **Journal Veterinary Diagnostic Investigation** 15:35-41. https://doi.org/10.1177/104063870301500108.

De Smit A J, Bouma A, Terpstra C, Van Oirschot, JT (1999) Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. **Veterinary Microbiology** 67:239-249. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00045-0.

Deregt D, Loewen KG (1995) Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. **Canadian Veterinary Journal** 36(6):371.

Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP (2000) PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus **Canadian Journal of Veterinary Research** 64(1):44.

Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Thiel HJ (2000) Genus pestivirus. **Virus Taxonomy** 867-872.

Fernelius AL, Amtower WC, Lambert G, McClurkin AW, Matthews PJ (1973) Bovine viral diarrhea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science** 37(1):13.

Finlaison DS, King KR, Frost MJ, Kirkland PD (2009) Field and laboratory evidence that Bungowannah virus, a recently recognised pestivirus, is the causative agent of the porcine myocarditis syndrome (PMC). **Veterinary Microbiology** 136(3-4):259-265. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.026

Gard JA, Givens MD, Stringfellow DA (2007) Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos**. Theriogenology** 68(3):434-442. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.003

Gatto I R H, Arruda P H, Visek CA, Victoria J G, Patterson A R, Krull A C, Schwartz K J, Oliveira LG, Arruda BL (2017) Detection of atypical porcine pestivirus in semen from commercial boar studs in the United States. **Transboundary and Emergence Disease** 65:339-343. https://doi.org/10.1111/tbed.12759.

Gethmann J, Homeier T, Holsteg M, Schirrmeier H, Saßerath M, Hoffmann B, Beer M, Conraths FJ (2015) BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. **Heliyon** 1(1):e00019. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00019

Givens MD, Newcomer BW (2015) Perspective on BVDV control programs. **Animal Health Research Reviews** 16(1):78-82.

Goldberg AG (2009) **Fatores de risco para a contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas conseqüências sobre a qualidade das doses inseminantes**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Gomes F (2018) Dados não publicados.

Grooms DL (2009) Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 20(1):5-19.

Houe H, Baker JC, Maes RK, Ruegg PL, Lloyd JW (1995) Application of antibody titers against bovine viral diarrhea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 7:327-332. https://doi.org/10.1177/104063879500700305.

Juonala T, Lintukangas S, Nurttila T, Andersson M (1998) Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. **Reproduction of Domestic Animals** 33(3-4) : 155-158.

King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (2011) Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier.

Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Stanley DF (1991) Replication of bovine viral diarrhea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections **Veterinary Research** 128:587-590.doi: 10.1136/vr.128.25.587

Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X (2007) Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus . **Virus Research** 129(1):26-34. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.05.002

Lanyon SR, Anderson ML, Bergman E, Reichel MP (2013) Validation and evaluation of a commercially available ELISA for the detection of antibodies specific to bovine viral diarrhoea virus (bovine pestivirus) **Austral Veterinary Journal** 91(1-2):52-56. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.01010.x

Lunardi M, Headley SA, Lisbôa JAN, Amude AM, Alfieri AA (2008) Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b **Research in Veterinary Science.** 85(3):599-604. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.01.002

Maes D, Van Soom A, Appeltant R, Arsenakis I, Nauwynck H (2016) Porcine sêmen as a vector for transmission of viral pathogens **Theriogenology** 85:27–38. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.0146

Mechler ML, dos Santos Gomes F, Nascimento KA, de Souza-Pollo A, Pires FFB, Samara, SI, et al (2018) Congenital tremor in piglets: Is bovine viral diarrhea virus an etiological cause? **Veterinary Microbiology** 220:107-112. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.009.

Medveczky I, Szabo I (1981) Isolation of Aujeszky's disease virus from boar semen **Acta Veterinaria Hungarica** 29(1) : 29-35.

Moennig V, Liess B (1995) Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 11:477-487. https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30462-X

McPherson FJ, Nielsen SG, Chenoweth PJ (1994) Semen effects on insemination outcomes in sows. **Animal Reproduction Science** (1-2):28-33. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.021

Ohmann HB (1983) Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. **Research Veterinary Science** 34(1):5-10.

Postel A, Hansmann F, Baechlein C, Fischer N, Alawi M, Grundhoff A, Baumgärtner W (2016) Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. **Science Reproduction**. 6:27735. https://doi.org/10.1038/srep27735

Ridpath J (2010) The contribution of infections with bovine viral diarrhea viruses to bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 26(2):335-348.

Silveira S, Weber MN, Mósena ACS, da Silva M. S, Streck A. F, Pescador CA, Canal, C. W (2017) Genetic diversity of Brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. **Transboundary and Emerging Diseases** 64(2):613-623.

Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Rico-Hesse R, Smith DB, Stapleton JT (2017) ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology** 98(1):2-3.

Shin J, Torrison J, Choi CS, Gonzalez SM, Crabo BG, Molitor TW (1997) Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. **Veterinary microbiology** 55(1-4):337-346.

Ståhl K, Beer M, Schirrmeier H, Hoffmann B, Belák S, Alenius S (2010). Atypical 'HoBi'-like pestiviruses—recent findings and implications thereof. **Veterinary Microbiology** 142(1-2):90-93. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.048

Strong R, La Rocca SA, Paton D, Bensaude E, Sandvik T, Davis L, Steinbach F (2015) Viral dose and immunosuppression modulate the progression of acute BVDV-1 infection in calves: evidence of long term persistence after intra-nasal infection. **PloS one** 10(5):e0124689. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124689

Tautz N, Tews BA, Meyers G (2015) The molecular biology of pestiviruses. In Advances in virus research (Vol. 93, pp. 47-160). **Academic Press**. https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.03.002

Thurmond MC (2005) Virus transmission Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management, and control. **John Wiley & Sons** 91-104.

Tischer I, Rasch R, Tochtermann G (1974) Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zenibl. Bukt** 226(2): 153-67.

Watson PF, Behan, JR. (2002). Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology** 57(6):1683-1693. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00648-9

Yeşilbağ K, Alpay G, Becher P (2017) Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. **Viruses** 9(6):128. doi:10.3390/v9060128

[1]Capítulo II - AUSÊNCIA DE EFEITOS DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA VIA REPRODUTIVA DE CACHAÇOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Gabriel Yuri Storino, Eduarda Bellini Xavier, Marina Lopes Mechler-Dreibi,Artur Simonatto, Igor Renan Honoratto Gatto, Maria Emilia Franco Oliveira, Edviges Maristela Pituco, Luís Guilherme de Oliveira

Resumo

Infecções causadas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina em suínos podem resultar em leucopenia transiente, gastroenterite crônica, septicemia, e lesões e hemorragicas. Tanto o vírus da Peste Suína Clássica (PSC) quando do Peste Vírus Atípico (APPV) são excretados no sêmen de cachaços infectados. Por compartilharem de regiões conservadas e apresentarem similaridade antigênica, é possível que não sejam as únicas espécies pertencentes ao gênero Pestivirus que possam ser excretadas no sêmen de suínos infectados. Em um primeiro momento, foram selecionados seis machos treinados para colheita de sêmen em manequim, dos quais foram colhidas amostras de sangue, sêmen e suabe prepucial a cada quatro dias até o 52º dia pós-inoculação com BVDV-2. Posteriormente, oito fêmeas foram adquiridas e alocadas em dois grupos: o grupo controle (n=2) e o grupo inseminado com sêmen contaminado com BVDV-2 (n=6) em laboratório, com o objetivo de mimetizar a transmissão do BVDV-2 via inseminação artificial. As a*mostras de sangue dos machos e das fêmeas, sêmen e suabe preprucial colhidos, foram testadas para a detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR. Uma alíquota de sangue total dos cachaços foi utilizada para realização de

[1] Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Theriogenology e encontra-se em avaliação para publicação.

análises hematológicas, as quais mostraram redução significativa na contagem de monócitos e aumento significativo na contagem de linfócitos quando comparados os períodos pré e pós-inoculação com BVDV-2. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram determinados por virusneutralização. Nenhum dos animais apresentou sinais clínicos e não foi observada excreção do BVDV-2 na via reprodutiva ou piora nos parâmetros seminais avaliados. A transmissão de BVDV-2 via inseminação artificial sob condições experimentais não foi observada. Sendo assim, concluímos que infecções por BVDV-2 em cachaços tenham baixo potencial de transmissão via sêmen e que o impacto sobre a qualidade seminal seja irrelevante.

Palavras – Chave: inseminação artificial, pestivirus, qualidade seminal, sêmen

1. Introdução

Além da espécie bovina, o BVDV pode infetar suínos e outras espécies domésticas (Ridpath, 2012). É descrito que infecções por BVDV em suínos, apesar de em geral cursarem sem manifestação clínica (Mechler et al., 2018, Pereira et al., 2018), podem resultar em leucopenia transiente, gastroenterite crônica, septicemia e lesões hemorrágicas (Stewart et al., 1971). Este vírus pode ainda desencadear alterações reprodutivas, como o nascimento de leitões de baixa viabilidade, ocorrência de mumificados e abortamento (Tao et al.,2013).

O BVDV pode ser transmitido por contato direto ou indireto entre animais e a excreção viral em bovinos pode ocorrer via nasal, ocular, genital, oral, leite, urina, sêmen e fezes. (Thurmond, 2005). Para a especie suína é relatada a excreção e transmissão viral via oronasal (Nascimento et al, 2018; Pereira et al, 2018), contudo, dados a respeito de outras vias de excreção em suínos é escassa. Um estudo realizado com suínos registrou a excreção do vírus no sêmen, nas fezes e urina de um cachaço persistemente infectado proveniente de uma leitegada congenitamente infectada. (Terpstra e Wensvoort, 1997). No sêmen de touros a excreção do vírus pode ocorrem em altas concentrações, entre 104 e 108 CCID50/ mL, por vários meses e até mesmo por toda a vida do animal (Givens et al., 2009),contudo, a infecção e a excreção viral não tem relação negativa com produção ou maturação das células espermáticas desta espécie (Voger et al., 1998).

Outros agentes pertencentes ao mesmo gênero, Pestivirus, como a Peste suína clássica (PSC) tem grande importância sanitária mundial a suinocultura e apresenta similaridade antigênica e de certos sinais clínicos com o BVDV (Terpstra e Wensvoort, 1988). A presença de agentes do gênero tem sido confirmada no sêmen de suíno. A excreção do vírus da PSC no sêmen suíno foi a primeira a ser relatada em condições de infecção natural e experimental

(Choi e Chase, 2003), bem como a transmissão do vírus para fêmeas via inseminação artificial e de forma vertical para os fetos (De Smit et al., 1999). Recentemente, o Atypical porcine pestivirus (APPV) também foi detectado no sêmen e secreções prepuciais de cachaços infectados de forma natural apresentando elevado número de cópias do vírus, cerca de 2 x 10^6 cópias/mL de sêmen (Gatto et al., 2018). Considerando que até o presente momento existem dados concretos a respeito atuação do BVDV no sistema reprodutivo de machos suínos infectados experimentalmente, objetivou-se com o presente estudo avaliar se cachaços infectados experimentalmente com o BVDV-2 tem alterações testiculares, epididimárias e em seus parâmetros seminais, bem como, se excreta o vírus pelo sêmen e avaliar a transmissão do BVDV-2 via inseminação artificial.

2. Material e Métodos

O estudo realizado foi em dois experimentos e os protocolos foram previamente aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA/19.242/16) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

2.1. O Inóculo

O inóculo utilizado para ambos os experimentos foi produzido a partir do isolamento do vírus de um caso clínico de bovino pelo Instituto Biológico de São Paulo. As doses infectantes de BVDV-2 não-citopático (ncp), estirpe LVB 16557/15, foram obtidas a partir da 6ª passagem em cultivo de células epiteliais de rim bovino da linhagem permanente "*Madine Darby bovine kidney*" (MDBK) com título de $10^{5,5}$ $TCID_{50}$.

2.2. Experimento I – Infecção experimental com BVDV- 2 ncp e avaliação dos efeitos reprodutivos em cachaços

Foram selecionados seis cachaços de linhagem comercial, os quais ao início do experimento estavam com 720 dias de idade e comprovadamente negativos para BVDV-1a (estipe NADL) e BVDV-2a (VS 253) por avaliação sorológica. No período pré-experimental, os machos foram treinados diariamente para colheita de sêmen em manequim pelo método da mão enluvada.

O período experimental teve duração de 68 dias. As colheitas iniciaram 16 dias antes da inoculação (D-16) e a inoculação dos seis animais ocorreu no Dia 0 (D0). Amostras de sangue e suabe prepucial foram colhidas até D44. Amostras para a avaliação dos parâmetros seminais foram colhidas até o D52.

2.2.1. Inoculação experimental

Para a inoculação dos machos, os animais foram sedados com Acepromazina 1% na dose de 0,25 mg/Kg administrada via intramuscular profunda, contidos e inoculados com 11,5 mL de inoculo por animal, sendo 5mL administrado pela via oral, 5 mL pela via nasal (2,5 mL em cada narina), 1 mL pela via intramuscular e 0,5 mL pela via intravenosa.

2.2.2. Metodologia de colheita

Durante todo o período experimental, os animais foram inspecionados diariamente e avaliados quanto à ocorrência de sinais clínicos como diarréia, apatia, alteração do apetite e redução de libido; indicativos qualitativos de alterações fisiológicas em decorrência da infecção por BVDV-2 ncp.

Os animais foram submetidos à colheita de sangue mediante punção da veia jugular com seringas estéreis e agulha 40 x 1,2 mm. As amostras de sangue obtidas foram separadas em tubos contendo EDTA para sangue total e em tubos com ativador de coágulo para a separação de amostras de soro. Estas últimas foram centrifugadas a 9000 x g por 15 minutos, aliquotada sem tubos de 2,0 mL e armazenadas em freezer a -20ºC para que fossem realizados os testes de virusneutralização. As amostras de sangue total foram imediatamente aliquotadas, sendo uma fração submetida ao hemocitômetro automático (pocH-100iV Diff - Sysmex do Brasil Indústria e Comércio Ltda.), seguido pela contagem diferencial de leucócitos em esfregaços sanguíneos corados pelo método de Rosenfeld (Jain, 1986), e outra fração acondicionada em microtubos estéreis graduados livres de DNAses e RNAses, imediatamente banhadas em nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da realização dos testes de RT-PCR.

Amostras de suabes da cavidade prepucial foram colhidas por meio da inserção do suabe pelo óstio prepucial, percorrendo o corpo do pênis e toda mucosa do divertículo. Os suabes colhidos foram depositados em microtubos estéreis livres de DNAsese RNAses, contendo 500µL de meio EMEM (Eagles Minimal Essential Medium)e armazenado em freezer a -80ºC, para posterior análises por RT – PCR.

A colheita de sêmen foi realizada após higienização das regiões abdominal e inguinal adjacentes ao pênis e a completa lavagem da cavidade prepucial. As amostras seminais foram colhidas em copo plástico de 500 mL acondicionado em caneca térmica aquecida. Filtro de papel sobre o recipiente coletor foi usado para a separação da fração gelatinosa e seu posterior descarte. Após colheita, o copo com sêmen foi imediatamente transferido para uma placa aquecedora a 37ºC e protegido contra a incidência de luz e correntes de ar. Todas as avaliações que se seguiram foram conduzidas com a máxima brevidade possível e sempre

pelo mesmo experiente técnico. Para o cálculo do volume total foi considerada apenas a fração líquida do ejaculado. Duas alíquotas de 1 mL de sêmen fresco foram depositadas em tubos livres de DNAses e RNAses, e imediatamente banhadas em nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento das análises de RT – PCR.

2.2.3. Analises seminais

Foram avaliados aspectos qualitativos quanto a coloração, odor e aspecto do ejaculado a fim de identificar possíveis alterações fisiológicas de ordem patológica.

Para as análises quantitativas de motilidade total (%), vigor (0-5, sendo 0 = imóvel e 5 = movimentos fortes e intensos) e aglutinação (%), uma gota de sêmen não diluído foi depositado entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas, e analisada em microscópio óptico em aumento de 200 vezes.

Análises de concentração espermática e teste de integridade de membrana foram feitos com a diluição do sêmen em água destilada (osmolaridade igual a 0) na proporção de 1:100 e avaliações em câmara de Neubauer sob microscópio óptico no aumento de 200 vezes, para contagem do número total de células espermáticas/mL e determinação do percentual de células com membrana plasmática lesada. Para esta última avaliação foi feita a avaliação de 200 células descontando espermatozóides que apresentavam cauda dobrada como defeito patológico, seguindo metodologia descrita por Jeyendran et al. (1984).

Análises de morfologia foram realizadas em preparado a partir de uma alíquota (10µL) de sêmen diluído em 0,5 mL de formol salina, seguido pela avaliação em câmara úmida e visualização em microscópio interferencial de contraste de fase (Zeiss Axio Scope Z2). Estabeleceu-se como critério a contagem de 200 células espermáticas, avaliando-se alterações acrossomáticas, de cabeça, na peça intermediária e cauda. Os defeitos foram classificados em

defeitos maiores e defeitos menores (Blom, 1973), suas porcentagens foram contabilizadas e o somatório representado como defeitos totais.

2.2.4. Analise anatomopatológica dos testículos

Ao término do período experimental (52 dias pós-inoculação - dpi), os seis animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de orquiectomia. A indução anestésica foi realizada com aplicação intramuscular de uma combinação de cetamina e diazepam, nas doses de 3 mg/kg e 0,5 mg/kg, respectivamente. Anestesia local foi feita com lidocaína 1% por toda a extensão da linha de incisão e diretamente no cordão, para realizar ligadura com fio de sutura e a secção, seguido da extração do testículo e epidídimo.Após o procedimento de orquiectomia, as porções externas e internas dos testículos foram avaliadas,macroscopicamente, quanto a presença de regiões lesadas indicativas de processo inflamatório agudo, crônico ou de lesão cicatricial. Fragmentos representativos com aproximadamente 1cm^3 foram selecionados a partir das regiões capsulares corticais, medulares e epididimárias. Os fragmentos selecionados foram fixados em formalina tamponada 10% por 48h, substituída por etanol 70% até que fossem confeccionadas as lâminas histológicas para coloração com hematoxilina/eosina e, posterior, avaliação em microscópio de luz quanto a presença de infiltrados de células mono e polimorfonucleares e demais alterações patológicas nos tecidos testiculares e epididimários, indicativas de resposta inflamatória em decorrência de infecção.

2.3. Experimento II – Mimetização da transmissão de BVDV-2 ncp via inseminação artificial

Foram selecionadas oito fêmeas primíparas de linhagem comercial, com 180 dias de idade e comprovadamente negativas para BVDV-1 e BVDV-2 por avaliação sorológica. As fêmeas

foram divididas em dois grupos: grupo controle (n=2) e grupo desafiado (n=6). Estes grupos foram mantidos em ambientes separados, a uma distância em linha reta de um quilometro e meio e manejados por equipes de profissionais distintas, visando eliminar a possibilidade de transmissão do agente entre os grupos após a inseminação artificial**.**

2.3.1. Inseminação

Visando mimetizar a transmissão do vírus via sêmen, as fêmeas do grupo desafiado receberam duas doses de sêmen contaminadas experimentalmente. Para tal, um total de 3 mL de inóculo de BVDV-2ncp (estirpe LVB 16557/15) foi adicionado à cada uma das doses de sêmen, instantes antes da inseminação, em ambiente laboratorial. A estirpe viral utilizada para a contaminação da dose inseminante foi a mesma utilizada no Experimento I. As fêmeas do grupo controle foram inseminadas com duas doses de sêmen comprovadamente livre de BVDV proveniente de animais sorologicamente negativos para BVDV-1 e BVDV-2.

2.3.2. Colheita de amostras e acompanhamento da gestação

Após a inseminação, as fêmeas passaram por colheita de sangue a cada quatro dias até o 60º dpi. A colheita de sangue e os procedimentos para obtenção e armazenamento de soro foram realizadas nas mesmas condições descritas no Experimento I. Durante todo o período pós-inseminação as fêmeas foram avaliadas diariamente quanto a ocorrência de abortamento e retorno ao estro. No 40º dia pós-inseminação, todas as fêmeas foram submetidas à ultrassonografia abdominal para a confirmação da prenhes.

2.4. Teste de virusneutralização

Com a finalidade de detectar anticorpos neutralizantes contra BVDV-2 nas amostras de soro colhidas de ambos os experimentos, foram realizados testes de virusneutralização em duplicata com diluições sucessivas de 1:10 até 1:5120. As amostras que apresentaram neutralização total de 100 TCID50 para a estirpe de BVDV-2 com concentrações a partir de

1:10 foram consideradas reagentes (OIE, 2015). Para a realização do teste foram utilizadas células MDBK e BVDV-2a (estirpe VS 253) como padrão. O título, resultado da virusneutralização, foi expresso pela recíproca da maior diluição reagente, desconsiderando efeitos citopáticos sobre a camada celular.

2.5. RT - PCR

As amostras de sangue total dos Experimentos I e II, suabe prepucial e sêmen do Experimento I foram avaliadas para a presença de BVDV-2 por RT-PCR na tentativa de detectar viremia. Todas as amostras foram submetidas ao processo de extração de RNA usando Trizol e a transcritas de RNA para cDNA por meio da reação de transcriptase reversa (AppliedBiosystems) de acordo com orientações do fabricante. Ao mix de PCR foram adicionados buffer 1X (50 mMKCl, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4)), 2 mM MgCl2, 0.2 mMdNTPs, 1.0 U Taq DNA polimerase, 5 pmol dos primers 103 (5′- TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC - 3′) e 392 (5′- ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC - 3′), que amplificam a região não traduzida de 290 pares de base (Weinstock et al., 2001), 3 µL de cDNA e o restante de água estéril para completar 20 µL. O termociclador foi programado em 95ºC por 2,5 minutos, e 35 ciclos a 94ºC por 30 segundos, 58ºC por 30 segundos, 72ºC por 40 segundos e um ciclo final a 72 °C por 10 min. Todas as amostras foram submetidas a reamplificação e visualizadas em gel de agarose 1%.

3. Análise estatística

O teste não-paramétrico de Friedman foi utilizado para comparações múltiplas entre os dias de colheita para variáveis quantitativas seminais e hematológicas registradas ao longo do experimento com os cachaços inoculados com BVDV-2, ao nível de significância de $p<0.05$ (Sheldon e Fillyaw, 1996). Para as análises estatísticas foi empregado o software R Project for

Statistical Computing (Team, 2018),RStudio®os pacotes: PMCMR (Pohlert, 2014) eggpubr (Kassambara, 2017).

4. Resultados

4.1. Sinais clínicos

No Experimento I não foram observados sinais clínicos indicativos de infecção pelo BVDV-2a (estirpe LVB 16557/15) em nenhum dos cachaços ao longo de todo o período experimental.

No Experimento II, todas as fêmeas tiveram gestação confirmada e nenhuma delas apresentou retorno ao estro ou abortamento durante o período de gestação acompanhado. Nenhum outro sinal clínico indicativo de viremia foi observado.

4.2. Análises seminais

Todas as amostras seminais apresentaram coloração esbranquiçada, aspecto leitoso e odor suis generis. O volume, percentual de aglutinação, motilidade total, vigor, concentração espermática e contagem de células com membrana lesada não diferiram ($p > 0,05$) entre os períodos pré- e pós-inoculação do agente viral. Entretanto, diferença ($p < 0,05$) entre os períodos foi observada para a ocorrência de alteração morfológica nas células espermáticas (percentual de defeitos totais) (Tabela 1). No comparativo entre todos os dias de colheita seminal, os percentuais de defeitos totais, registrados nos dias D-12 (5,50 ± 2,46%) e D-8 (5,25 ± 2,11%) foram maiores ($p<0,05$) do que os valores observados nos Dias 40 (1,00 ± 0,80%) e 44 (1,50 ± 0,51%) (Gráfico 1).

4.3. Anatomopatologia testicular

Não foram observadas alterações de integridade dos tecidos. A consistência e coloração também indicavam a normalidade. Na avaliação microscópica de fragmentos destes órgãos, não foram registradas quaisquer sinais de inflamação ou presença de infiltrados de células mononucleares ou polimorfonucleares.

4.4. Análises hematológicas

Os valores percentuais de hematócrito, do número de plaquetas e do número das células de defesa (i.e. eosinófilos, neutrófilos segmentados e bastonetes) não diferiram ($p > 0,05$) entre os períodos, pré-inoculação e pós-inoculação (Tabela 3). Apenas as contagens de células mononucleares, linfócitos e monócitos, apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos, pré- e pós-inoculação ao longo do período de avaliação. Enquanto se registrou redução na contagem de monócitos para o período pós-inoculação, a contagem de linfócito aumentou (Tabela 3). O valor absoluto de linfócitos observados nos Dias -12 (2,70 ± 0,30 x $10^3/\mu L$) e -8 (2,70 ± 0,70 x $10^3/\mu L$) diferiram ($p < 0,05$) dos registrados nos Dias 1 (7,10 ± 0,80 x $10^3/\mu L$), 12 (5,70 ± 0,50 x $10^3/\mu L$), 20 (7,00 ± 0,70 x $10^3/\mu L$) e 32 (6,80 ± 0,60 x $10^3/\mu L$) (Gráfico 2).

O valor absoluto de monócitos observados nos Dias -12 (3,80 ± 0,50 x $10^3/\mu L$), -8 (5,20 ± 0,30 x $10^3/\mu L$) e -4 (4,70 ± 0,30 x $10^3/\mu L$) diferiram ($p<0,05$) dos registrados nos Dias 36 (0,10 ± 0,09 x $10^3/\mu L$) e 40 (0,09 ± 0,03 x $10^3/\mu L$). Ainda, o valor visto no Dia -16 (2,90 ± 0,40 x $10^3/\mu L$) diferiu ($p < 0,05$) daquele visto no Dia 40, enquanto que o do Dia -8 foi diferente ($p < 0,05$) daqueles vistos nos Dias 4 (0,50 ± 0,10 x $10^3/\mu L$), 6 (0,46 ± 0,07 x $10^3/\mu L$), 20 (0,4 ± 0,03 x $10^3/\mu L$), 28 (0,5 ± 0,01 x $10^3/\mu L$), 36, 40 e 44 (0,3 ± 0,02 x $10^3/\mu L$) (Gráfico 3).

4.5. Virusneutralização

Observou-se soroconversão em quatro cachaços. O macho 1 apresentou título de anticorpos neutralizantes apenas no Dia 36, os machos 3 e 4 no Dia 40 e o macho 6 entre os Dias 20 e 33 (Tabela 3).

Não foram observados títulos de anticorpos contra BVDV-2 em nenhuma das fêmeas inseminadas durante todo o período avaliado

4.6. RT- PCR

Não foi detectado RNA viral em nenhuma amostra de sêmen, suabe prepucial ou sangue durante todo o período.

Da mesma forma, não foi detectado o RNA viral no sangue de nenhuma das fêmeas do Experimento II.

5. Discussão

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato sobre a ação do BVDV nos órgãos reprodutivo de suínos. Foi constatado que a inoculação experimental do BVDV-2 (estirpe LVB 16557/15) impactou diretamente na imunidade inata dos cachaços, promovendo quadros de linfocitose e monocitopenia. A respeito da imunidade adquirida, os títulos de anticorpos detectados no Experimento I foram baixos com diferenças entre os períodos de detecção entre os animais. Não foram detectados anticorpos neutralizantes em nenhuma das fêmeas do Experimento II. Ademais, não foi detectada a excreção viral via sêmen nem nas secreções prépuciais. Os achados indicam que os cachaços foram eficientemente infectados pela amostra viral, contudo a viremia não foi detectada. Efeito reprodutivo causado pela ação do

BVDV-2 não foi observado nos machos infectados nem nas fêmeas desafiadas. Assim, nas condições do presente estudo, a infecção de machos suínos com BVDV-2 comprova a ausência de excreção viral pela via reprodutiva, ausência de efeito negativo sobre parâmetros seminais avaliados na rotina bem como a ausência de sinais de infecção nas fêmeas desafiadas com BVDV-2 pela via reprodutiva.

Nos períodos pré e pós – inoculação dos machos suínos, foram avaliadas alterações nas variáveis hematológicas em decorrência da infecção viral. No período pré-inoculação, os valores hematológicos se mantiveram dentro da normalidade, e a partir de D1 se iniciou um processo de aumento e diminuição nas contagens de linfócitos e monócitos, respectivamente. O BVDV é um agente viral que tem predileção por replicação em células de defesa, principalmente linfócitos, mas também infecta monócitos e células dendríticas. Como apresentadoras de antígenos, as células dendríticas exercem um importante papel na imunidade celular por dar início à resposta imune não –específica contra diversos agentes patogênicos (Chase, 2013). A infecção do BVDV promove a lise de monócitos como mecanismo de evasão do sistema imune, prejudicando o reconhecimento e o subsequente desenvolvimento de uma resposta imune-humoral específica (Iwasaki et al. 2010).

Foi possível detectar anticorpos neutralizantes em quatro dos seis animais infectados do Experimento I. Observou-se que houve uma detecção tardia na maioria dos animais, levando em conta que a soroconversão em suínos infectados ocorre aproximadamente na terceira semana pós inoculação (Walz, 2004). Foi possível detectar títulos de anticorpos neutralizantes em diferentes momentos, contudo foram títulos baixos (10). Estes dados estão de acordo com o encontrado na literatura, em que estudos prévios demonstraram que, em infecções experimentais, o BVDV em suínos levam a uma resposta imune mais branda e irregular (Almeida et al., 2018; Mechler et al., 2018; Pereira et al., 2018; Santos et al., 2018), quando

comparada ao que ocorre em bovinos (Houe, 1995). Acredita-se que a monocitopenia em decorrência da infecção por BVDV, tenha influenciado diretamente na fraca resposta imune-humoral no Experimento I.

Não foi evidenciada qualquer ocorrência de sinal clínico nos animais infectados com BVDV-2, o que condiz com estudos anteriores que demonstraram que a infecção experimental por BVDV-2 em suínos cursa sem manifestação clínica da doença (Mechler et al., 2018; Pereira et al., 2018, Santos et al., 2017).

A infecção experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) não resultou em mudanças no período pós- em relação ao pré-inoculação, na maioria das características seminais avaliadas. Apenas os defeitos totais variaram entre os períodos, mas inesperadamente com redução de seus valores após a inoculação do agente viral. Ao nosso entendimento, este achado não parece estar relacionado diretamente ao efeito estudado, embora todas as medidas experimentais necessárias foram adotadas para que a interferência fosse exclusiva da introdução do vírus.

Variações climáticas, como elevadas temperatura ambiental e umidade promovem o aumento do desconforto térmico dos animais e, por consequência, pode ter efeitos negativos sobre parâmetros seminais (Suriyasomboonet al., 2005). Em uma avaliação retrospectiva,o índice de estresse por calor foi aferido segundo o cálculo estabelecido pelo NWSCR (1976) e adaptado por Lucas (2000), revelando que o índice para o mês anterior (67.05b ± 0.50) ao início do período pré-inoculação quando comparado ao mês de início das colheitas (69.66a± 0.35) e o mês seguinte (71.98a± 0.40, $P<0,05$ pelo teste de Tukey). O aumento do índice condiz com a maior ocorrência de defeitos totais espermáticos observados, no entanto, não foram observadas ocorrências de defeitos que extrapolassem a normalidade ou que pudesse ser considerado como indicativos de baixa qualidade seminal segundo critérios estabelecidos

pelo Colégio Brasileiro De Reprodução Animal, para a espécie (CBRA, 2013). Além da discreta diferença entre os valores de defeitos morfológicos apresentados no período pré-inoculação, nenhuma das demais variáveis analisadas apresentou diferença ao longo do período amostrado.

Diferentemente do que foi registrado por Terpstra e Wensvoort (1997) no estudo com um cachaço persistentemente infectado e por Givens et al., (2003), com bovinos infectados experimentalmente, constatamos que suínos infectados de forma aguda não apresentaram excreção do BVDV-2 no sêmen, bem como nas secreções prepuciais. Provavelmente, a transmissão do BVDV pela via reprodutiva ocorra apenas em casos atípicos de suínos persistentemente infectados de forma congênita como descrito por Terpstra e Wensvoort (1997).

Em ambos os estudos realizados, apesar de esforços para realizar colheitas de sangue em intervalos pequenos de quatro dias, não foi possível detectar viremia. A hipótese mais provável é de que infecções por BVDV promovam viremia transiente e em curtos intervalos sem padrão estabelecido (Mechler et al, 2018). Levando em conta que a viremia tenha sido branda e transiente nos animais infectados com BVDV-2 no presente estudo, a probabilidade de que o vírus circulante no sangue alcançasse diferentes órgãos era baixa. Considerando que os testículos apresentem a barreira hematotesticular, as chance de o vírus atingir sêmen foram ainda menores, o que explica a ausência de detecção do RNA viral na via reprodutiva dos cachaços inoculados experimentalmente. Embora infecções por BVDV em suínos em geral cursem sem manifestação clínica, existem relatos a respeito de estirpes a campo que promovam efeitos reprodutivos em suínos (Terpstra, 1991). Estabelecer a ação e disseminação do BVDV pela via reprodutiva do macho suíno é uma informação valiosa considerando que

biotecnicas reprodutivas exercem papel expressivo na transmissão de agentes patogênicos para rebanhos livres (Maes, 2016).

6. Conclusão

A infecção experimental com BVDV-2 estirpe LVB16557/15 em cachaços resultou em quadros de linfocitose e monocitopenia. Não foi observada a excreção do agente nem piora nos parâmetros seminais de avaliação de rotina. Também não foi detectada a viremina nem anticorpos neutralizantes nas fêmeas desafiadas com BVDV pela via reprodutiva.

7. Agradecimentos

Agradecemos à Andreia Souza Ramos de Medeiros do Setor de Viroses da Reprodução da FCAV pela colaboração com as análises sorológicas ao Dr. Fernando José Zara e à Msc. Maria Alice Garcia Bento do Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML) da FCAV pela colaboração com análises de morfologia espermáticas, ao Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV pelo espaço cedido para a realização das análises de RT-PCR, ao Dr. Paulo Alécio Canola e aos Médicos Veterinários residentes em Cirurgia Cirúrgica de Grandes Animais: Ana Luiza C. R. G. Oliveira, Carolina Isabel Soriano Oporto, Gabriel Paiva Domingues do Amaral, Lucas Ferreira Mendonça, Mayara Cardoso dos Anjos e Pedro Henrique Dias Nunes pelos auxílios prestados com os procedimentos de orquiectomia dos machos suínos.

8. Financiamento

Somos gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de fundos para pesquisa (2016/02982-3) e a bolsa de Mestrado para GYS (2017/00950-0). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Somos gratos também ao CNPq pela concessão de bolsa de produtividade para MEFO

9. Conflito de interesses

Nenhum

10. Declaração de interesse

Nenhum

11. Referências

Almeida HMS, GattoIRH , Santos ACR, Ferraudo AS, Samara, SI, Oliveira LG. A Cross-Sectional and Exploratory Geospatial Study of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infections in Swines in the São Paulo State, Brazil. Pak Vet J 2018;37:470-474.

Almeida FFL, Leal MC, Franca LR. Testismorphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (SusscrofaScrofa). BiolReprod .2006;75:792–799.https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053835.

Baker JC. Bovine viral diarrhea virus: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1987; 190:1449-1458.

BauermannFV, Ridpath JF. HoBi-like viruses–the typical ‘atypical bovine pestivirus’. Anim Health Res Rev. 2015;16:64-69.https://doi.org/10.1017/S146625231500002X.

Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram. Nord. Vet. Med.1973;25:383-391.

Brodersen, BW. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. Vet Pathol. 2014; 51(2): 453-464. https://doi.org/10.1177/0300985813520250.

Chase, C. C. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. Biologicals, 2013 ; 41(1) : 52-60.https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.009

Choi C, Chae C. Detection of classical swine fever virus in boar semen by reverse transcription–polymerase chain reaction. J VetDiagn Invest. 2003;15:35-41. https://doi.org/10.1177/104063870301500108.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Christopher CL, Yaeger MJ, Benfield DA. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. J VetDiagn Invest. 1995 ; 7(4) : 456-464.

Colégio Brasileiro De Reprodução Animal – CBRA. Manual para exame e avaliação de sêmen animal.3ªed., Belo Horizonte : CBRA ; 2013

De Smit A J, Bouma A, Terpstra C, Van Oirschot, JT. Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. Vet. Microbial.1999;67:239-249. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00045-0.

Floegel G, Wehrend A, Depner KR, Fritzemeier J, Waberski D, Moennig V. Detection of classical swine fever virus in semen of infected boars. Vet. Microbiol. 2000; 77:109-116. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00267-4.

Flores EF, Weiblen R, Gil LHVG, Tobias FL, Lima M, Garcez DC, Botton AS. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Brasil; implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2000 ; 52(1) : 11-17.

Gatto I R H, Arruda P H, Visek CA, Victoria J G, Patterson A R, Krull A C, Schwartz K J, Oliveira LG, Arruda BL. Detection of atypical porcine pestivirus in semen from commercial boar studs in the United States. TransboundEmerg Dis. 2017; 65:339-343. https://doi.org/10.1111/tbed.12759.

Gethmann J, Homeier T, Holsteg M, Schirrmeier H, Saßerath M, Hoffmann B, Beer M, Conraths FJ. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. Heliyon. 2015 ; 1(1) : e00019. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00019

Givens MD, Heath AM, Brock KV, Brodersen BW, Carson RL, StringfellowDA . Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. Am J Vet Res. 2003; 64: 428-434.https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.428

Givens MD, Riddell KP, Edmondson MA, Walz PH, Gard JA, Zhang Y, Galik PK, Brodersen BW, Carson RL, Stringfellow DA. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. Vet Microbiol. 2009 ; 139(1-2) : 42-51. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.029

Guerin B, Pozzi N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. Therio. 2005 ; 63(2) : 556-572

Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. Can J Vet Res. 2000 ; 64(1) : 44.

House BM, Collin EA, Peddireddi L, Yuan F, Chen Z, Hesse RA, Anderson G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. J. Gen. Virol.2005; 96:2994–2998.doi: 10.1099/jgv.0.000251

Houe H, Baker JC, Maes RK, Ruegg PL, Lloyd JW. Application of antibody titers against bovine viral diarrhea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. J Vet Diagn Invest. 1995; 7:327-332. https://doi.org/10.1177/104063879500700305.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science. 2010 ; 327 : 291-295. doi: 10.1126/science.1183021

Jain NC. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Lea &Febiger. 1986; 4.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J ReprodInfertil. 1984 ; 70 : 219-228.https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219.

Kassambara A. ggpubr:“ggplot2” based publication ready plots. R package version 0.1, 6. 2017.

Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Stanley DF. Replication of bovine viral diarrhea virus in the bovine reproductive tract and excretionof virus in semen during acute and chronic infections. Vet. Rec.1991; 128:587-590.doi: 10.1136/vr.128.25.587

Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X. Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. Virus Res. 2007 ; 129(1) : 26-34. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.05.002

Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD. Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. Philos Trans R SocLond B Biol Sci. 2010; 365:1593-1605.doi: 10.1098/rstb.2009.0251

Lamp B, Schwarz L, Högler S, Riedel C, Sinn L, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Ladinig A, Rümenapf T. Novel pestivirus species in pigs, Austria, 2015. Emerg Infect Dis. 2015 ; 23(7): 1176.

Loeffen WLA, Van Beuningen A, Quak S, Elbers A.R.W. Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population.
Vet. Microbiol. 2009 ; 136 : 240–245. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.01.

Lucas EM, Randall JM, Meneses JF. Potential for evaporative cooling during heat stress periods in pig production in Portugal (Alentejo). Journal of Agricultural Engineering Research. 2000 ; 76(4), 363-371.

Lugar DW, Ragland D, Stewart KR. Influenza outbreak causes reduction in semen quality of boars. JSHAP. 2017 ; 25(6) : 303-307.

Maes D, Van Soom A, Appeltant R, Arsenakis I, Nauwynck H. Porcine sêmen as a vector for transmission of viral pathogens. Theriogenology. 2016 ; 85 : 27 – 38. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.0146

Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T, Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. Vet Pathol. 2009 ; 46 (4) : 707-716. https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0234-O-FL

McNitt JI, First NL. Effects of 72—hour heat stress on semen quality in boars. InternationalJournalofBiometeorology. 1970; 14(4) : 373-380.
Mechler ML, dos Santos Gomes F, Nascimento KA, de Souza-Pollo A, Pires FFB, Samara, SI, et al. Congenital tremor in piglets: Is bovine viral diarrhea virus an etiological cause?.VetMicrobiol. 2018 ; 220 : 107-112. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.009.

Medveczky I, Szabo I. Isolation of Aujeszky's disease virus from boar semen. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 1981 ; 29(1) : 29-35.

Meyling A, Jensen AM. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. Vet. Microbiol. 1988; 17(2) :97-105.https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90001-6

MoennigV, Liess B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. Vet Clin North Am Food AnimPract. 1995; 11:477-487. https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30462-X

Niskanen R, Alenius S, Belak K, Baule C, Belak S, Voges, H, Gustafsson H. Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. ReprodDomest Anim.2002;37(3):171-175.

NWSCR. Livestock hot weather stress. Regional operations manual letter C-31-76. 1976

OIE -World Organization For Animal Health. Bovine Viral Diarrhea In: Manual of 414 Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BVD.pdf / ; 2015: .698-710 . [accessed 10 September 2018].

Passler T, Walz PH. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. Anim Health Res Rev. 2009 ; 11(2) : 191-205. https://doi.org/10.1017/S1466252309990065

Pereira DA, Peron JB, Almeida HM, Baraldi TG, Gatto IRH, Kasmanas TC, Pituco ME, Montassier HJ, Oliveira LG. Experimental inoculation of gilts with bovine viral diarrhea virus 2 (BVDV-2) does not induce transplacental infection. Vet Microbiol. 2018; 225: 25-30. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.003.

Pohlert T. The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package. 2014; 27.

Ramirez-Mendoza H, Hernandez-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-Lopez J, KennedyS.Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. J CompPathol. 1997; 117(3) : 237-252. https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80018-7

Rivera-Benitez JF, Martínez-Bautista R, Pérez-Torres A, del Carmen García-Contreras, A, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez-Mendoza H (2013). Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. Vet. Microbiol. 2013 ; 162(2-4) : 491-498.https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.037.

Ridpath JF, Bauermann FV, Flores EF. Flaviviridae. In: Flores, E.F. (Ed.),VirologiaVeterinária. 2ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. pp. 565–589

Santos ACR, Nascimento KA, Mechler ML, Almeida HMS, Gatto IRH, Carnielli LG, Souza-Pollo A, de Oliveira, LG. Experimental Infection and Evaluation of Airborne Transmission

and Nose-To-Nose Contact of Bovine Viral Diarrhea Virus Among Weaned Piglets. AJBAS. 2017 ; 11 : 12-19. doi : 10.22587/ajbas.2017.11.15.3

Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Rico-Hesse R, Smith DB, Stapleton JT. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. J Gen Virol. 2017 ; 98(1) : 2-3.

Sheldon MR, Fillyaw MJ, Thompson WD. The use and interpretation of the Friedman test in the analysis of ordinal-scale data in repeated measures designs. Physiother Res Int. 1996 ; 1(4) : 221-228.

Shin J, Torrison J, Choi CS, Gonzalez SM, Crabo BG, Molitor TW. Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. Vet microbiol, 1997 ; 55(1-4) : 337-346.

Suriyasomboon A, Lundeheim N, Kunavongkrit A, Einarsson S. Effect of temperature and humidity on sperm morphology in Duroc boars under different housing systems in Thailand. J Vet Med Sci. 2005; 67(8): 777-785.

Team RC. R. A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

Terpstra C, Wensvoort G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. Res Vet Sci. 1988 ; 45(2):137-142.

Terpstra C, Wensvoort G. Bovine virus diarrhea virus infections in swine. TijdschrDiergeneeskd. 1991 ; 116(19) : 943-948.

Voges H, Horner GW, Rowe S, Wellenberg GJ. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. Vet Microbiol. 1998 ; 61(3) : 165-175. doi:10.1016/s0378-1135(98)00177-1.

Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase 458 PCR assay for detection of BVDV in pooled bovine serum. J ClinMicrobiol. 2001; 39 : 343–346. doi: 10.1128/jcm.39.1.343-346.2001

Weiss DJ. Schalm's Veterinary Hematology. 6ª ed. Iowa :Wiley-Blackwell; 2010. cap. 109. p. 843-851.

Yeşilbağ K, Alpay G, Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. Viruses. 2017 ; 9(6) : 128. doi:10.3390/v9060128

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Valores das variáveis seminais nos períodos, pré e pós – inoculação, de cachaços submetidos a inoculação experimental com o BVDV-2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0 do Experimento I (Mediana ± erro padrão da mediana).

Parâmetro	Pré-inoculação (Dias -16 a -4)	Pós-inoculação (Dias 1 a 52)	Valor de P*
Volume (mL)	168,50 ± 5,30	147,50 ± 4,50	0,10
Aglutinação (%)	5,00 ± 1,60	5,00 ± 1,40	0,50
Motilidade total (%)	90,00 ± 1,40	90,00 ± 0,90	0,50
Vigor (0-5)	4,00 ± 0,10	4,00 ± 0,06	0,50
Concentração espermática (x 10^6células/mL)	372,0 ± 3,30	383,0 ± 1,70	0,10
Defeitos maiores (%)	2,50 ± 1,90	1,20 ± 0,20	0,01
Defeitos menores (%)	2,00 ± 0,50	1,00 ± 1,70	0,02
Defeitos totais (%)	5,00 ± 2,50	2,50 ± 0,30	$5x10^{-3}$
Células com membrana lesada (%)	3,70 ± 0,80	3,90 ± 0,30	0,20

* Valores de P foram calculados pelo teste de Friedman

Tabela 2. Valores dos parâmetros hematológicos nos períodos pré e pós – inoculação de cachaços submetidos a inoculação experimental do BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15)no Dia 0 do Experimento I (Mediana ± erro padrão da mediana).

Parâmetros	**Pré-inoculação (Dias -16 a -4)**	**Pós-inoculação (Dias 1 a 44)**	**Valor de P***
Hematócrito (%)	43,95 ± 0,92	40,70 ± 0,70	0,08
Plaquetas (10^3/µL)	249,50 ± 13,90	219,50 ± 8,80	0,6
Leucócitos (10^3/µL)	12100 ± 1614	11950 ± 442,70	0,07
Basófilos (10^3/µL)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,64
Eosinófilos (10^3/µL)	720,00 ± 116,38	632,50 ± 53,20	0,06
Bastonetes (10^3/µL)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
Segmentados (10^3/µL)	4273,50 ± 996,90	3831,50 ± 338,20	0,05
Linfócitos (10^3/µL)	2765,50 ± 304,70	6391,00 ± 204,40	0,01
Monócitos (10^3/µL)	4525,00 ± 313,60	480,00 ± 61,75	$4,17 \times 10^{-5}$

* Os valores de P foram calculados pelo teste de Friedman

Tabela 3.Títulos de anticorpos neutralizantes detectados,pela técnica de virusneutralização, no soro sanguíneo dos cachaços inoculados experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) ao longo do período do Experimento I, de D-16 a D44.

Animal	Detecção de anticorpos (dias pós-inoculação)	Título
1	36°	10
2	-	10
3	40°	10
4	40°	10
5	-	10
6	20° - 33º	10

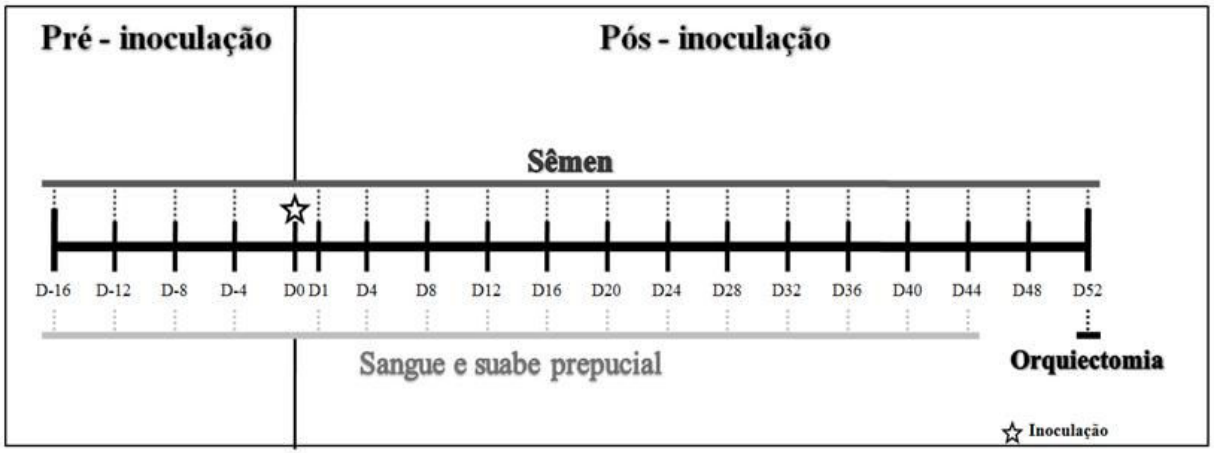

Figura 1. Representação esquemática da metodologia experimental adotada no Experimento I, com destaque ao momento (Dia 0) da inoculação experimental do BVDV- 2 não-citopático(estirpe LVB 16557/15)em cachaços, pelas vias oral, nasal, intramuscular e intravenosa, e momentos de colheitas de amostras seminais, de sangue e suabe prepucial

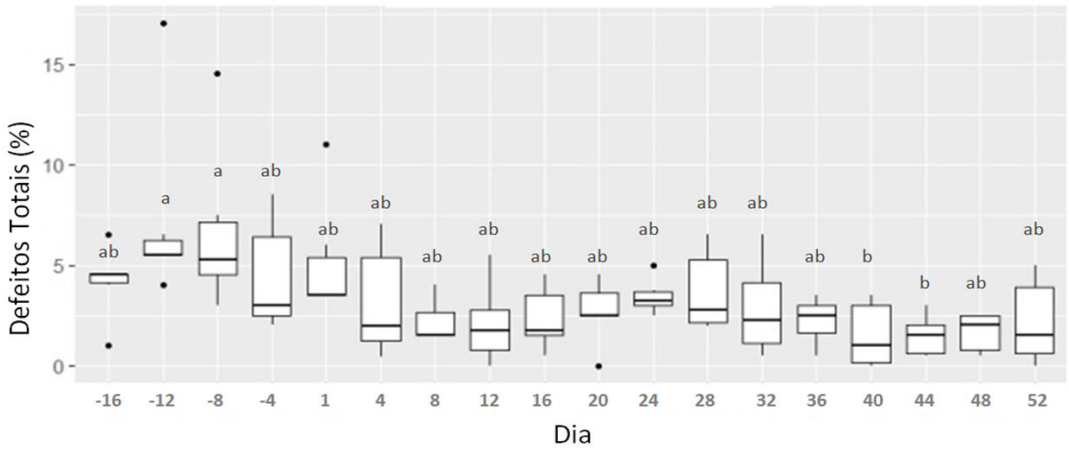

Gráfico 1. Porcentagens (mediana ± erro padrão da mediana) de defeitos totais das células espermáticas de cachaços submetidos a inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

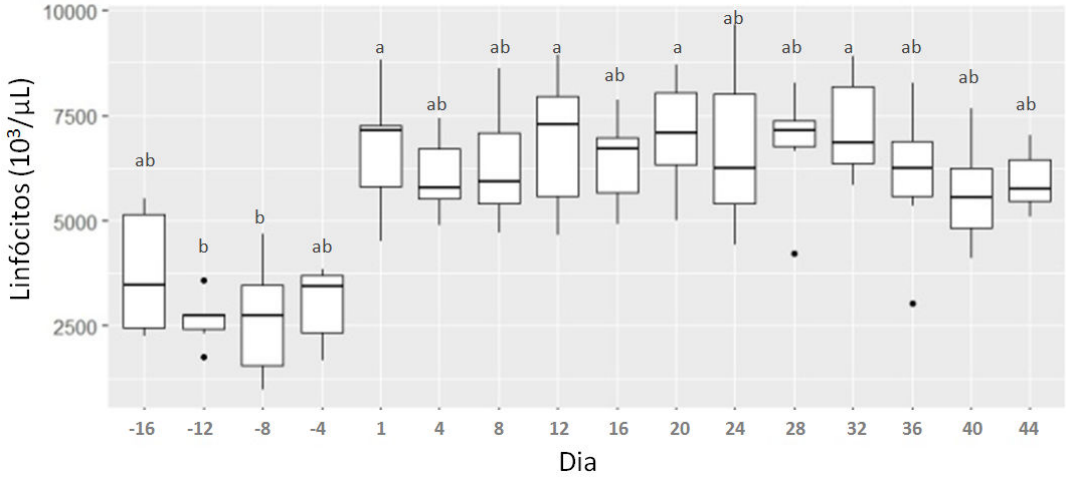

Gráfico 2. Valores (mediana ± erro padrão da mediana)de contagens linfócitos por µL de sangue de cachaços submetidos a inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

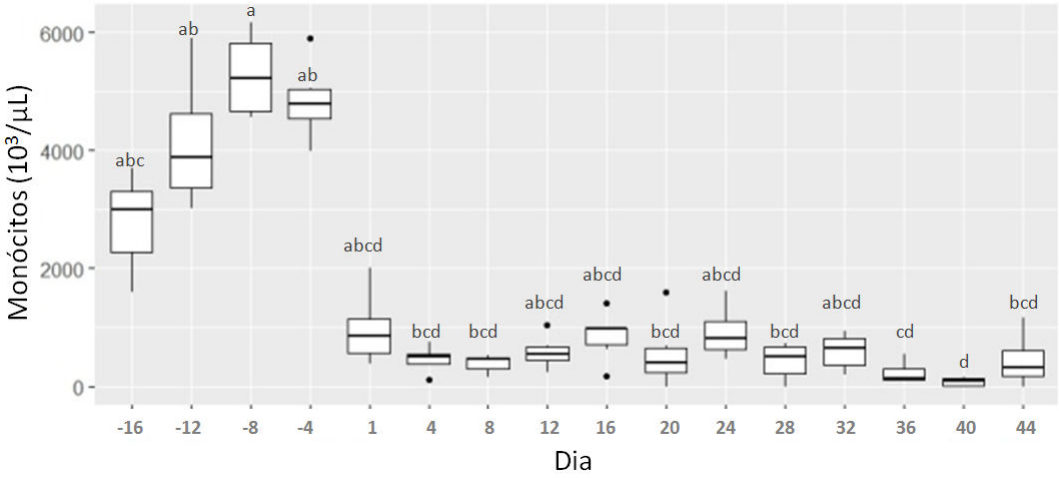

Gráfico 3. Valores (mediana ± erro padrão da mediana) de contagem de monócitos por µLde sangue de cachaços submetidos a inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).