

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSMISSÃO SEXUAL DE *Toxoplasma gondii*
(Nicolle & Manceaux, 1909) EM OVINOS (*Ovis aries*).**

**Welber Daniel Zanetti Lopes
Médico Veterinário**

JABOTICABAL, SÃO PAULO - BRASIL

Maio de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSMISSÃO SEXUAL DE *Toxoplasma gondii*
(Nicolle & Manceaux, 1909) EM OVINOS (*Ovis aries*).**

Welber Daniel Zanetti Lopes

**Prof. Dr. Alvimar José da Costa
Orientador**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Mai de 2010

Trabalho realizado no “Centro de Pesquisas em Sanidade Animal-CPPAR/FCAV/UNESP, no departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV-UNESP e no Laboratório de protozoologia molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

“Aprendi... Que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser, e devo ter paciência. Mas, aprendi também, que eu posso ir além dos limites que eu próprio coloquei...”

Charles Chaplin

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Welber Daniel Zanetti Lopes – filho de Renato Martins Lopes e Maria de Fátima Zanetti Lopes, nasceu em 18 de Fevereiro de 1981, na cidade de São João da Boa Vista/SP. Em 1999 ingressou no Centro Universitário da Fundação de Ensino “Octávio Bastos” (UNIFEOB), onde em 2003 formou-se em Medicina Veterinária. Médico Veterinário (Pesquisador) do “CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal - FCAV/UNESP” a partir de 2004. Neste mesmo ano, foi selecionado para o Mestrado, pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva, da FCAV-UNESP-Jaboticabal. Obteve o título de Mestre em de 2007, ano em que ingressou no curso de Doutorado nesta mesma Faculdade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Renato e Fátima e irmãos Wilton e Werik, por me incentivarem nesta caminhada. Agradeço a Deus, todos os dias, por fazerem parte da minha vida. Vocês são minha motivação.

À minha esposa e futura mãe dos meus filhos Luciane, pelo amor, companheirismo, paciência, por estar sempre ao meu lado e também ser uma das minhas maiores incentivadoras.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e paz.

Ao **Prof. Dr. Alvimar José da Costa** pelo voto de confiança, por estes seis anos de orientação, paciência, incentivo e pelas grandes oportunidades a mim concedidas. Ao senhor “meu pai profissional” meu eterno muito obrigado.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de estudo, fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao **CPPAR – Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – FCAV/UNESP**, por ter me proporcionado conhecimentos essenciais à minha formação técnica e sustentação no decorrer dos cursos de pós-graduação (Mestrado e Doutorado).

Aos Profs. **Drs. Ângelo Pires do Prado, Júlio César de Carvalho Balieiro e Gilson Pereira de Oliveira**, pelos quais sempre terei enorme respeito, carinho e admiração. Obrigado mais uma vez, pelo incentivo à investigação científica.

Aos Professores **Dr. Carlos N. Kaneto, César Roberto Esper, Flávio Ruas de Moraes, Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira e ao João Luis Garcia**, pelas transmissões de seus conhecimentos e pelos valiosos conselhos e sugestões.

Aos bolsistas **Ricardo dos Santos da Silva (FAPESP), Walter Matheus Rossanese (FAPESP), Joana D'Ark F. Rodrigues (CNPq) e Fernando Augusto de Souza (CNPq)**. Indispensáveis na condução deste trabalho. Obrigado, todo este resultado é nosso.

Ao Prof. **Msc. Jorge Luiz Naliate Nunes**, pela minha indicação ao CPPAR/UNESP.

A todos os Professores da pós-graduação da FCAV-UNESP, pela transmissão de seus conhecimentos.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária de São João da Boa Vista/SP **Afonso Celso Navarro e Maria Cândida Oliveira Costa** pelo incentivo durante o período acadêmico, o que certamente refletiu na minha escolha profissional.

À **família CPPAR** - "Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR)": Carol, Cláudio, Danilo, Edmilson, Helenara, Luis Fernando, Marcos, Thaís, Roberto, Vando e Walter pela companhia e também pela valiosa colaboração neste projeto.

Em especial, à **Ana Lúcia Doni** e ao **Fortunato Alexandre Ferreira**, com os quais aprendi muito e que também contribuíram muito para a realização e finalização deste trabalho

Ao Prof. **Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi** e ao **Dr. Wilton Carlos Zanetti Lopes**, ambos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, e também ao **Werik Renato Zanetti Lopes**, estudante do curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Alfenas, pelo apoio na execução da técnica de PCR.

Aos Profs. **Drs. Anderson Barbosa de Moura, Katia Denise Saraiva Bresciani** e ao **Msc. Tiago Pereira Arantes** da empresa “Intervet/Schering Plough”, pela atenção e apoio durante toda execução deste projeto.

Aos Doutores **Rodrigo Valarelli** e **Pablo Paiva**, em nome dos quais agradeço a todos os amigos da Pfizer pela confiança em mim depositada e pelas oportunidades a mim concedidas. Muito obrigado.

À Profa. **Dra. Rosângela Zacarias Machado** e aos técnicos de laboratório do departamento de Zootecnia (**João** e **Paulo**) pelo auxílio e orientação sobretudo na execução da RIFI.

Ao Prof. **Dr. Vando Edésio Soares** pelo auxílio na execução das análises estatísticas.

À Professora **Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto**, da UNESP – Câmpus de Araçatuba, SP, pelo auxílio na interpretação dos resultados histopatológicos.

A **Dra. Mabel** do Departamento de Reprodução (FCAV/UNESP), pelo apoio e auxílio na aquisição dos animais deste experimento.

Às minhas avós (**Yolanda Giollo Zanetti e Diva Adami Chaim**) tios, primos e amigos pelo carinho e apoio. Eu amo a nossa família!

Ao meu padrinho "**Tio Marco**" e madrinha "**Tia Zezinha**". Se disserem que o afilhado tem semelhanças do padrinho e da madrinha, é com muito orgulho que digo que me pareço com vocês.

Aos meus tios **Laércio e Leni**, graças a vocês que eu decidi fazer Medicina Veterinária. Muito Obrigado!

Ao meu sogro **Chaim** e a minha sogra **Jalilia**, agradeço pela educação, atenção, o apoio, amparo, carinho e compreensão. A vocês minha eterna gratidão.

Aos meus vizinhos e cunhados **Caroline e Marcelo**.

Aos meus afilhados, nada comportados, **Ana Beatriz, Giulia, Marcos César e Miguel**, "adoro a companhia de vocês".

Aos eternos amigos **João Bosco e Fábio Habermann**, colegas de classe durante a graduação.

Ao **Hélio Aparecido Sérgio** “Helinho”, a quem sempre serei grato pelos ensinamentos referentes a minha disciplina pessoal e profissional.

Aos fieis amigos **Dilssélio Paim** e **Aurélio Leão** de Formiga.

Aos companheiros de república **Ivan**, **Cleidson** e **Júlio**.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação pessoal e profissional. A vocês todos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
1.1. Aspectos Gerais do Parasito.....	03
1.2 Transmissão para o homem.....	05
1.3 Toxoplasmose em ovinos (Problemática).....	08
1.4 Justificativa.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
3.2 Obtenção de cistos cerebrais contendo bradizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
3.3. Obtenção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
3.4. Obtenção de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
3.5 Confeccção de lâminas com antígeno para RIFI.....	17
MACHOS - (MATERIAL E MÉTODOS)	
3.6. Seleção dos ovinos machos reprodutores experimentais.....	17
3.7 Condicionamento dos ovinos reprodutores à colheita de sêmen.....	19
3.8 Inoculação dos ovinos reprodutores machos.....	19

3.9 Exames clínicos e laboratoriais nos machos.....	20
3.9.1 Parâmetros clínicos.....	20
3.9.2. Resposta Imune-humoral dos machos.....	20
3.10. Exames no sêmen dos ovinos infectados experimentalmente por <i>Toxoplasma gondii</i>	21
3.10.1. Colheitas do sêmen.....	21
3.10.2. Parâmetros espermáticos.....	22
3.10.2.1 Motilidade e vigor.....	22
3.10.2.2 Concentração e volume.....	22
3.10.2.3 Morfologia espermática.....	22
3.11. Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> no sêmen dos ovinos pelo bioensaio.....	22
3.12 Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> no sêmen dos ovinos pela PCR.....	23
3.12.1. Extração do DNA das amostras do controle positivo e das amostras de sêmen e tecidos do ovinos machos reprodutores.....	23
3.12.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	24
3.12.3 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados na PCR.....	25
3.13. Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> em testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata dos ovinos machos reprodutores.....	25
3.13.1. Exames anátomo-histopatológicos dos machos.....	25
3.13.2. Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> nos tecidos do sistema reprodutor dos machos pelo bioensaio	25
3.13.3. Pesquisa do DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> nos tecidos dos ovinos machos pela PCR	26

FÊMEAS E FILHOTES – (MATERIAL E MÉTODOS)

3.14 Seleção das ovelhas reprodutoras para a realização da Monta Natural.....	27
3.15 Adaptação das ovelhas reprodutoras ao manejo empregado.....	27
3.16 Delineamento experimental para realização da monta natural nas ovelhas por machos controle (não inoculados) e experimentalmente infectados com <i>Toxoplasma gondii</i>	28
3.17 Determinação dos dias pós-inoculação em que os reprodutores inoculados com <i>Toxoplasma gondii</i> e não infectado (controle), realizarão a monta natural nas fêmeas selecionadas.....	29
3.18 Programa de sincronização de cio utilizado nas ovelhas reprodutoras.....	30
3.19 Exames clínicos e laboratoriais nas ovelhas reprodutoras.....	31
3.19.1 Parâmetros clínicos.....	31
3.19.2 Resposta imune humoral das fêmeas.....	31
3.19.3 Determinação da parasitemia nas ovelhas.....	31
3.20 Resposta imune humoral dos filhotes.....	32
3.21 Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> nos tecidos das ovelhas e em seus respectivos filhotes.....	32
3.21.1 Exames histopatológicos, bioensaio e PCR.....	32
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Obtenção de cistos cerebrais contendo bradizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	35
5.2 Obtenção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	35
5.3 Obtenção de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	36

MACHOS (RESULTADOS)

5.4 Seleção dos ovinos machos reprodutores experimentais.....	36
5.5 Condicionamento dos ovinos à colheita de sêmen.....	37
5.6 Exames clínicos dos machos.....	38
5.6.1 Parâmetros clínicos (pré-inoculação).....	38
5.6.2 Parâmetros clínicos (pós-inoculação).....	41
5.6.2.1 Temperatura corporal.....	41
5.6.2.2 Frequência cardíaca.....	43
5.6.2.3 Frequência respiratória.....	45
5.6.2.4 Outros sinais clínicos.....	48
5.7 Resposta Imune Humoral.....	49
5.8 Exames do sistema reprodutor dos ovinos infectados experimentalmente.....	51
5.8.1 Parâmetros espermáticos.....	51
5.9 Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> no sêmen dos ovinos pelo bioensaio.....	57
5.10 Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> no sêmen dos ovinos pela PCR.....	58
5.11 Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> em testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata dos ovinos reprodutores.....	59
5.11.1 Exames anátomo - histopatológicos dos ovinos machos.....	59
5.11.2 Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> nos diferentes tecidos dos ovinos machos reprodutores pelo Bioensaio.....	59
5.11.3 Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> nos diferentes tecidos dos ovinos machos reprodutores pela PCR.....	59

FÊMEAS E FILHOTES - (RESULTADOS)

5.12 Seleção das ovelhas reprodutoras para realização da Monta natural.....	60
5.13 Exames clínicos nas ovelhas reprodutoras.....	62
5.13.1 Parâmetros clínicos pré-monta natural.....	62
5.13.2 Parâmetros clínicos pós-monta natural.....	68
5.13.2.1 Temperatura corporal (retal).....	68
5.13.2.2 Freqüência cardíaca.....	73
5.13.2.3 Freqüência respiratória.....	78
5.14 Resposta Imune Humoral das fêmeas.....	83
5.15 Resposta imune humoral dos filhotes.....	85
5.16 Determinação da parasitemia nas ovelhas.....	87
5.17 Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> nos tecidos das ovelhas reprodutoras.....	89
5.17.1 Exames anatomo - histopatológicos das ovelhas reprodutoras.....	89
5.17.2 Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> nos tecidos das ovelhas pelo bioensaio.....	92
5.17.3 Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> nos tecidos das ovelhas pela PCR.....	93
6.DISSCUSSÃO.....	97
6.1 Discussão – Obtenção de oocistos e seleção dos ovinos.....	97
6.2 Discussão – Machos.....	97
6.3 Discussão – Fêmeas e Filhotes.....	101
7. CONCLUSÕES.....	106
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Ocorrência de anticorpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos pertencentes a diversas regiões do Brasil.....	09
Tabela2. Delineamento experimental dos machos reprodutores.....	19
Tabela3. Protocolo de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	24
Tabela 4. Delineamento experimental das ovelhas submetidas à monta natural por carneiros inoculados com <i>Toxoplasma gondii</i> e não infectado.....	28

Tabela 5. Determinação dos dias pós-inoculação em que o reprodutor infectado com $2,0 \times 10^5$ oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> , realizou a monta natural nas fêmeas selecionadas.....	29
Tabela 6. Determinação dos dias pós-inoculação em que o reprodutor infectado com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> , realizou a monta natural nas fêmeas selecionadas.....	30
Tabela 7. Determinação dos dias pós-inoculação em que o reprodutor não infectado (controle), realizou a monta natural nas fêmeas selecionadas.....	30
Tabela 8. Número de oocistos eliminados por gatos experimentalmente infectados com cistos da cepa “P” de <i>Toxoplasma gondii</i>	35
Tabela 9. Anticorpos contra infecção por <i>Toxoplasma</i> , <i>Neospora</i> , <i>Brucela</i> e <i>Leptospira</i> dos ovinos examinados para seleção e formação dos grupos experimentais.....	37
Tabela 10. Temperaturas retais, freqüências cardíaca e respiratória mensuradas nos ovinos selecionados durante o período pré-inoculação.....	39
Tabela 11. Temperatura retal mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	41

- Tabela 12.** Freqüências cardíacas mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.....43
- Tabela 13.** Freqüências respiratórias mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.....45
- Tabela 14.** Médias e desvio padrões dos parâmetros clínicos observados nos períodos pré (dia -1) e pós-inoculação (dia 3 a70) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*..... 47
- Tabela 15.** Recíproca dos títulos sorológicos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) nos ovinos machos não inoculado (controle) e infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii*..... 50
- Tabela 16.** Parâmetros seminais de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.....52
- Tabela 17.** Resultados das análises paramétricas e não paramétrica dos parâmetros seminais nos períodos pré (dia -1) e pós- inoculação (dia 3 a70) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*..... 53

Tabela 18. Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos inoculados com amostras seminais oriundas dos reprodutores ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	57
Tabela 19. Anticorpos contra infecção por <i>Toxoplasma</i> , <i>Neospora</i> , <i>Brucela</i> e <i>Leptospira</i> das ovelhas examinadas para seleção e formação dos grupos experimentais.	61
Tabela 20. Temperatura retal (°C) mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).....	63
Tabela 21. Frequência cardíaca mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).....	64
Tabela 22. Frequência respiratória mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).....	65
Tabela 23. Temperaturas retais mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos <i>Toxoplasma gondii</i>	69 e 70

Tabela 24. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro temperatura retal (°C) de ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos *Toxoplasma gondii*..... 71

Tabela 25. Frequências cardíacas mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.....74 e 75

Tabela 26. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro frequência cardíaca (bpm) de ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos *Toxoplasma gondii*..... 76

Tabela 27. Frequências respiratórias mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.....79 e 80

Tabela 28. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro frequência respiratória (mpm) de ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos *Toxoplasma gondii*..... 81

Tabela 29. Recíproca dos títulos sorológicos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em ovelhas expostas à monta natural pelo macho não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.....84

Tabela 30. Recíproca dos títulos sorológicos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) dos filhotes das ovelhas expostas à monta natural pelos machos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii* ou não inoculado (controle)..... 86

Tabela 31. Surtos parasitêmicos detectados em ovelhas expostas à monta natural pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii* ou não inoculado (controle).....88

Tabela 32. Achados histopatológicos em fragmentos de tecidos de ovelhas, e seus respectivos filhotes, submetidas à monta natural pelos machos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, ou não inoculado (controle).....91

Tabela 33. Resumo dos resultados, encontrados no presente trabalho, referentes ao diagnóstico (direto e indireto) e isolamento de *Toxoplasma gondii*, tanto em amostras seminais dos ovinos reprodutores, quanto nos tecidos das fêmeas expostas à monta natural e de seus respectivos filhotes.....96

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. (A) Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia pela polimerase (PCR), a partir de amostras seminais dos ovinos experimentalmente infectados.....	11
Figura 1. (B) Vesícula seminal demonstrando agrupamento de taquizoítos com imunoreatividade ao <i>Toxoplasma gondii</i> . Ovino inoculado com taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> . Obj. 40x.....	11
Figura 2. Protocolo de sincronização com norgestomet e gonadotrofina sérica eqüina.....	31
Figura 3. Média das temperaturas retais, freqüências cardíacas e respiratórias mensuradas nos carneiros reprodutores durante o período pré-inoculação.....	40

Figura 4. Temperatura retal mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	42
Figura 5. Freqüência cardíaca mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	44
Figura 6. Freqüência respiratória mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	46
Figura 7. Volume espermático médio (mL) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	54
Figura 8. Motilidade espermática média (%) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	54
Figura 9. Vigor espermático médio (0 - 5) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	55
Figura 10. Concentração espermática média ($\times 10^6$) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos <i>Toxoplasma gondii</i>	55

Figura 11. Alterações espermáticas médias de cabeça (%) em ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	56
Figura 12. Alterações espermáticas médias de cauda (%) em ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	56
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras seminais dos ovinos experimentalmente infectados.....	58
Figura 14. Fotomicrografia do sistema reprodutor mostrando infiltrado inflamatório focal mononuclear intersticial em próstata do ovino infectado com oocistos e em vesícula seminal do ovino inoculado com taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	59
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do “pool” das amostras de tecidos (testículos, vesícula seminal, próstata e epidídimos) dos ovinos experimentalmente infectados.....	60
Figura 16. Médias das temperaturas retais mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).....	66
Figura 17. Médias das freqüências cardíacas mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).....	66

- Figura 18.** Médias das freqüências respiratória mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural)..... 67
- Figura 19.** Temperaturas retais médias mensuradas nas ovelhas após a cobertura pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*..... 72
- Figura 20.** Freqüências cardíacas média mensuradas nas ovelhas após a cobertura pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*..... 77
- Figura 21.** Freqüências respiratórias média mensuradas nas ovelhas após a cobertura pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.... 82
- Figura 22.** Ovelha número 238 com 65 dias de gestação, sorologicamente positiva para *Toxoplasma gondii* após ser exposta à monta natural pelo ovino 1234 (inoculado com taquizoítos)..... 89
- Figura 23.** Cisto de *Toxoplasma gondii* detectado pela técnica histopatológica em cérebro da ovelha 238, sorologicamente positiva para *Toxoplasma gondii* após ter sido exposta à monta natural pelo ovino 1234 (inoculado com taquizoítos) 40X..... 92
- Figura 24.** Cistos de *Toxoplasma gondii* em cérebros de camundongos inoculados com “pool” de tecidos de ovelhas naturalmente infectadas, após terem sido expostas à monta natural, por ovinos inoculados com oocistos ou taquizoítos deste coccídio. Obj. 40x.....92 e 93

Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do “pool” das amostras de tecidos das ovelhas naturalmente infectadas ou não, via sêmen pelo macho infectado com oocistos de *Toxoplasma gondii*, e seus respectivos filhotes..... 94

Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do “pool” das amostras de tecidos das ovelhas naturalmente infectadas ou não, via sêmen pelo macho infectado com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, e seus respectivos filhotes..... 95

ABREVIações

DNA: ácido desoxirribonucléico

DPI: dias pós-inoculação

DPMN: dias pós-monta natural

EDTA: etilenodiaminotetraacetic Acid

EV: endovenosa

FSH: hormônio folículo estimulante

HCL: ácido clorídrico

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IM: intramuscular

IP: intraperotonia

LH: hormônio luteinizante

mL: mililitros

NaCL: cloreto de sódio

PCR: reação em cadeia pela polimerase

RIFI: reação de imunofluorescência indireta

SC: subcutânea

SRD: sem raça definida

UV: ultravioleta

VO: via oral

TRANSMISSÃO SEXUAL DE *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) EM OVINOS (*Ovis aries*).

RESUMO

Ovinos machos isentos de *Toxoplasma gondii*, foram distribuídos em três grupos sendo, G1: um ovino inoculado, pela via oral, com $2,0 \times 10^5$ oocistos da cepa P, G2: um ovino infectado, pela via subcutânea, com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos da cepa RH e G3: um ovino não infectado mantido como controle. Após a inoculação dos machos com *T. gondii*, 12 ovelhas reprodutoras, não gestantes, sorologicamente negativas para doenças reprodutivas, sobretudo toxoplasmose, foram sincronizadas e em seguida expostas à monta natural pelos machos, anteriormente inoculados, sendo: cinco ovelhas submetidas à monta natural pelo macho do G1; cinco ovelhas expostas à monta natural pelo macho do G2 e duas ovelhas pelo macho pertencente ao grupo controle. Nos soros das ovelhas obtidos nos dias -30, -14, -7, -1, zero (antes da monta natural) e nos dias 1, 3, 5, 7, 11, 14 e semanalmente até o parto, foi pesquisada a presença de anticorpos contra *T. gondii* pela RIFI. Bioensaio em camundongos e PCR foram realizados em amostras de sêmen e tecidos dos machos, tecidos das fêmeas e de seus respectivos filhotes. Cinco das 12 fêmeas utilizadas apresentaram anticorpos específicos contra *T. gondii* após a monta natural, sendo duas pelo macho inoculado com oocistos (G1) e três pelo ovino infectado com taquizoítos (G2). Pelo bioensaio foi possível diagnosticar, no dia da monta natural, a presença do *T. gondii* em amostras seminais dos ovinos infectados (G1 e G2) e em amostras do "pool" de tecidos das cinco fêmeas e em cinco de seus respectivos filhotes. Foi possível, ainda, pela técnica da PCR isolar o DNA de *T. gondii* em amostras seminais dos machos reprodutores no dia do coito, e no "pool" de tecidos de uma e duas fêmeas expostas à monta natural por reprodutores infectados com oocistos e taquizoítos, respectivamente. É importante relatar que, por meio desta técnica foi possível diagnosticar a presença deste parasito, também, no "pool" de tecidos de filhotes de uma fêmea submetida à monta natural pelo ovino infectado com oocistos. Pelos resultados obtidos, comprova-se a transmissão sexual do *Toxoplasma gondii* na espécie ovina por meio da monta natural, com conseqüente transmissão vertical para os cordeiros, fato inédito na literatura.

Palavras-chave: Monta natural, ovinos, transmissão sexual, toxoplasmose.

SEXUAL TRANSMISSION OF *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) IN SHEEP (*Ovis aries*).

ABSTRACT

Male sheep in reproductive age and with no prior *Toxoplasma gondii* disease, were divided into three groups: G1, a sheep inoculated with 2.0×10^5 of P strain oocysts; G2, a sheep infected with 1.0×10^6 of RH strain tachyzoites and; G3 a control uninfected sheep. After inoculation of males with *T. gondii*, 12 breeding ewes, not pregnant, serologically negative for reproductive diseases, particularly toxoplasmosis, were synchronized and then exposed to natural mating by those males, previously inoculated, being: five ewes submitted to natural mating by male G1, five ewes exposed to natural mating by the male of G2 and two ewes submitted to natural mating by the male control from group. In sera obtained from all ewes on days -30, -14, -7, -1, zero (before natural mating) and on days 1, 3, 5, 7, 11, 14 and weekly until partum, was investigated the presence of antibodies against *T. gondii* by IFAT. Bioassay and PCR were performed on samples of semen and tissues of males/females tissues and their offspring. Five of the 12 females submitted to natural mating, had antibodies anti-*T. gondii*, being, two by male inoculated with oocysts (G1) and three for sheep infected with tachyzoites (G2). For the bioassay was possible to diagnose on the day of natural mating, the presence of *T. gondii* in semen samples from infected sheep (G1 and G2) and in samples of pool of tissues from five females and five of their puppies. It was also possible by PCR to isolate the DNA of *T. gondii* in semen samples of rams on sexual intercourse, and the pool of tissues of one and two females exposed to breeding by natural mating infected with tachyzoites and oocysts, respectively. It is important to report that through this technique it was possible to diagnose the presence of this parasite also in the pool of tissue from the offspring of a female submitted to the natural breeding sheep infected with oocysts. From the results, we verify the sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep through natural mating, with subsequent vertical transmission in sheep, unpublished fact in literature.

Keywords: Natural mating, sheep, sexual transmission, toxoplasmosis.

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 - Aspectos Gerais do Parasito

Em 1908, uma nova espécie de protozoário, formadora de cistos teciduais, foi isolada em coelhos de biotérios, na cidade de São Paulo (SPLENDORE, 1908) como também em um pequeno roedor (*Ctenodactylus gondii*), por NICOLLE & MANCEAUX, no Norte da África. Em 1909, com um aprimoramento nos estudos, NICOLLE & MANCEAUX criaram nome genérico e específico para este parasito: *Toxoplasma gondii*.

A partir daí, este agente mereceu a atenção de pesquisadores de todo o mundo, sendo imprescindível enfatizar que a ciência brasileira contribuiu e continua contribuindo muito, desde a descrição da referida espécie (SPLENDORE, 1908; MIGLIANO, 1912; NEVES et al., 1954; CAMARGO, 1964; COSTA et al., 1977; VIDOTTO et al., 1986; KANETO et al., 1997; NAVARRO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001; GENNARI, et al., 2004; GARCIA, et al., 2006; MOURA et al., 2007; ARANTES et al., 2009; BRESCIANI et al., 2009; SCARPELII et al., 2009; LOPES et al., 2010).

Este protozoário é um coccídio intracelular obrigatório, com ampla distribuição geográfica capaz de infectar uma grande variedade de células nucleadas de hospedeiros vertebrados. Na maioria dos casos, esta zoonose produz, dependendo do modo de transmissão, infecção assintomática em seus hospedeiros devido à rápida indução da resposta celular imune mediada, o que resulta no controle da multiplicação dos taquizoítos estabelecendo a infecção crônica (YAP & SHER, 1999).

Embora exista variabilidade entre as propriedades biológicas de diferentes cepas, que influenciam na sua patogenicidade (CRISTINA et al., 1991), as amostras até o presente estudadas são antigênicas e morfologicamente semelhantes, o que leva ao reconhecimento de apenas uma espécie do gênero *Toxoplasma*: *Toxoplasma gondii* (TENTER & JOHSON, 1997).

DUBEY & BEATTIE (1988), em revisão sobre *T. gondii*, classificaram, em camundongos, as amostras isoladas até então, em altamente virulentas, de virulência intermediária e não virulentas. Essas diferenças foram principalmente atribuídas a

fatores como capacidade de penetração e taxa de crescimento celular e conversões de taquizoítos em bradizoítos e vice-versa (DARDE 2004).

No ciclo de vida de *T. gondii*, observa-se três formas infectantes do parasito: os oocistos (contendo dois esporocistos e quatro esporozoítos), os taquizoítos (presentes em vacuolos parasitófagos) e os bradizoítos (localizados em cistos teciduais).

Os oocistos, produto final da reprodução sexuada e que ocorre somente no trato digestivo dos felídeos, seus hospedeiros definitivos, desenvolvem-se na presença de oxigênio e em temperaturas mais baixas que a corpórea, permanecendo viáveis, dependendo das condições ambientais, por até cinco anos na presença de umidade e sendo muito resistente a maioria dos desinfetantes (VIDOTTO et al., 1986). Eles são a chave para a manutenção da infecção, pois o carnivorismo e a transmissão congênita não completam o ciclo de vida deste coccídeo nos hospedeiros intermediários (NETO et al., 1995).

Os felídeos eliminam os oocistos depois de ingerir qualquer um dos três estágios do parasito (DUBEY et al., 1998). Um único gato pode liberar 20 milhões de oocistos por dia em aproximadamente 20 gramas de fezes (FAYER, 1981) e, após decomposição das fezes, a contaminação do solo pode ser de 100.000 oocistos/grama (FRENKEL et al., 1995). Todos os gatos domésticos são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, embora animais mais jovens, com até um ano de idade, primoinfectados, eliminem um número maior de oocistos nas fezes após terem ingerido cistos teciduais contendo o agente. Gatos adultos, primoinfectados, também eliminam oocistos, porém em menor quantidade e por um período mais curto (LINDSAY et al., 1997).

Embora a maioria dos gatos que já tiveram contato com *T. gondii* desenvolva imunidade e não volte a eliminar oocistos, DUBEY & FRENKEL (1974) comprovaram que gatos soropositivos, frente a quadros de imunossupressão, podem retomar a eliminação dos mesmos. Posteriormente, DUBEY (1995) reinfetou gatos soropositivos, seis anos após terem soroconvertido, e 55% destes reeliminaram oocistos nas fezes, porém em quantidades bem inferiores às primoinfecção.

O fato dos felídeos serem os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, foi reforçado por TENTER et al. (2000) que relataram uma evidência epidemiológica em ilhotas e

atóis que nunca foram habitados por gatos, inexistem virtualmente as infecções por esse agente .

O termo taquizoíto (*tachos*, do grego, rápido) foi dado por FRENKEL, em 1973, para descrever o estágio no qual o parasito se multiplica rapidamente em qualquer célula do hospedeiro intermediário, destacando-se o sistema mononuclear fagocitário, células do parênquima de vários órgãos e nas células epiteliais intestinais do hospedeiro definitivo. Essa replicação processa-se até que a célula hospedeira seja destruída e os taquizoítos liberados repitam o ciclo em uma nova célula hospedeira (PETRAK & CARPENTER, 1965). O grau de destruição celular e posterior doença dependem do equilíbrio entre os taquizoítos e da habilidade do hospedeiro em inibir a multiplicação do parasito. Quando este equilíbrio acontece, os taquizoítos começam a se multiplicar mais lentamente e se acumulam nos tecidos, sendo então denominados de bradizoítos (BUXTON et al., 2002).

O termo bradizoíto (*brady*, do grego, lento) também foi dado por FRENKEL (1973), para descrever o organismo multiplicando-se lentamente dentro de um cisto tecidual, embora os cistos teciduais se desenvolvam em órgãos viscerais, incluindo o pulmão, fígado e rins. Eles são mais prevalentes nos tecidos neurais e musculares, incluindo o cérebro, os olhos e músculos esqueléticos e cardíacos. Cistos teciduais intactos, podem não causar nenhum dano e persistir por toda a vida no hospedeiro, em estado de latência (DUBEY 1986; HESSLER et al., 1971; PETRAK & CARPENTER, 1965). Entretanto, estudos posteriores realizados por RUSSEL et al. (2002) e DARDE (2004), revelam que, dependendo do estado imunológico de cada hospedeiro, poderá ocorrer a retro-conversão de bradizoítos em taquizoítos, fazendo com que o hospedeiro volte a manifestar a fase aguda da doença e posteriormente, assim que o estado imunológico do hospedeiro se reestabelcer, adquirir novos cistos teciduais em outros órgãos além dos já existentes.

1.2- Transmissão para o homem

Dubey (1986) estabelece a transmissão, desta enfermidade, basicamente por três vias: fecal-oral, carnivorismo e congênita.

Em relação à via fecal-ora, os felídeos excretam, por um período de quatro a 14 dias, juntamente com as fezes, oocistos não esporulados de *T. gondii* e, portanto, não infectantes. A esporulação pode levar de um a cinco dias, dependendo das condições ambientais, após a defecação, quando esses oocistos tornam-se infectantes para outras espécies (DUBEY, 1994a).

No carnivorismo, a infecção ocorre pela ingestão de cistos contendo bradizoítos e/ou taquizoítos, presentes na carne de um hospedeiro intermediário (DUBEY, 1996). Quanto à resistência dos cistos na carne, acredita-se que os mesmos não resistam aos processos de salga e aquecimento (acima de 55° C por mais de dois minutos), utilizados na confecção de carnes industrializadas (DUBEY, 1994b). Entretanto, outros estudos ressaltam que o processo de cura, carnes embutidas (principalmente na forma de salsichas e salames) ou resfriadas, podem representar uma importante via de transmissão da toxoplasmose e podem também ser responsáveis pela alta prevalência de lesões oculares por toxoplasmose no Sul do Brasil (GLASNER et al., 1992; ARIAS et al., 1996).

A infecção pela carne pode acontecer não somente pelo consumo, como também pela manipulação da mesma crua durante o preparo do alimento, contato com superfícies de preparação de alimentos, facas e outros utensílios (SMITH et al., 1992). Estudos recentes realizados por LIU et al., (2009) evidenciaram que o ato das mulheres grávidas experimentarem o tempero das carnes cruas enquanto preparam os alimentos, é um dos principais fatores de risco para que estas mulheres adquiriram a toxoplasmose durante a gravidez.

Existe também a possibilidade de disseminação da doença nos zoológicos com o uso diário de equipamentos, concomitantemente, no recinto dos felídeos, tais como botas, luvas, pás, vassouras e mangueiras (DUBEY, 1986).

Outra via de transmissão reconhecida é contato com cães, devido ao comportamento de alguns deles de ingerir e rolar sobre fezes de gatos, talvez atraídos pelo cheiro. Este comportamento foi denominado de xenosmofilia e possibilitaria a transmissão pelo contato com oocistos esporulados presentes na pelagem de cães que vivem em áreas muito contaminadas (FRENKEL, & PARKER, 1996).

Menos freqüente, porém possível, a infecção pode se dar por meio de ingestão de leite não pasteurizado com taquizoítos, já descrita em caprinos por CHIARI et al. (1984), acidentes laboratoriais (WONG & REMINGTON, 1993), transfusão sangüínea (FIGUEROA-DAMIAN, 1998) e transplante de órgãos (MUNIR et al., 2000). Em mulheres, embora não se tenha comprovado a transmissão através da amamentação, BONAMETTI et al. (1997) descrevem um caso positivo de toxoplasmose em uma criança, cuja dieta era constituída exclusivamente por leite materno, e a mãe fazia parte de um grupo de 17 indivíduos que havia adquirido toxoplasmose pela ingestão de carne ovina crua. Neste caso, um inquérito sorológico na propriedade de origem dos ovinos revelou 43% dos animais soropositivos para toxoplasmose.

O risco de aquisição desta enfermidade na vida pós-natal, também foi demonstrado por DUBEY et al. (1998), GIRALDI et al. (2001), SILVA et al. (2001), KRAVETZ FEDERMAN, 2005; BACHMEYER et al., 2006 e HUNG et al., 2007.

Em humanos, a infecção é muito comum, porém a enfermidade clínica é pouco freqüente. Estima-se que um terço, ou mais, da população possua anticorpos contra o parasita. Somente nos EUA é provável que ocorram 1.437.500 novos casos de infecção por *T. gondii* (TODD, 1989). Ainda nos EUA, segundo SAAD et al. (1996), aproximadamente 300 pessoas morrem anualmente devido à toxoplasmose, tanto na sua forma congênita (neonatos) quanto em indivíduos com severa imunossupressão iatrogênica (transplantados, tratamento de neoplasias, pacientes submetidos à diálise renal) ou que sofram de enfermidades imunossupressoras como doenças auto-imunes ou a síndrome de imunodeficiência adquirida – SIDA (SMITH, 1993).

Em pacientes portadores do vírus HIV, a toxoplasmose manifesta-se com uma elevada freqüência, sendo considerada uma doença oportunista (LUTF & REMINGTON, 1988) que provoca a reativação dos cistos, principalmente os cerebrais, produzindo grave encefalite (PASSOS et al., 2000; HALONEN et al., 2001 e KHETSURIANI et al., 2002; MAMIDI et al., 2002; COLLAZOS, 2003; YADAV et al., 2004; PRADHAN et al., 2007). POTASMAN et al. (1987) observaram uma freqüência de encefalite por *T. gondii* entre seis e 10% de pacientes aidéticos nos EUA. No Brasil, em pacientes acima de 12 anos de idade, a toxoplasmose é a terceira doença associada mais prevalente, com 11.809 (3,72%) dos 314.582 casos notificados entre 1980 e 1996 (BRASIL, 1996).

1.3- Toxoplasmose em ovinos (Problemática)

A toxoplasmose em ovinos foi descrita pela primeira vez por OLAFSON & MONLUX (1942), nos Estados Unidos, em uma ovelha com sintomatologia nervosa, aumento de temperatura e rigidez muscular.

Desde então, a infecção toxoplásmica na espécie ovina tem merecido a atenção dos pesquisadores que se dedicam a Medicina Veterinária e Saúde Pública, uma vez que esta doença acarreta prejuízos econômicos, por abortamento e natimortalidade em ovinos de diversas regiões do Mundo (BEVERLEY & WASTON, 1961; DUBEY, 1968; JACOBS & MOYLE, 1963; HARTLEY & MUNDAY, 1974). Estudos conduzidos no Uruguai apontaram a toxoplasmose como um problema importante nos rebanhos ovinos, promovendo prejuízos anuais de US\$ 1,4 a 4,7 milhões (FREYRE et al., 1997).

A transmissão de *T. gondii* para os ovinos é principalmente atribuída à eliminação de oocistos nas fezes dos gatos sobre as pastagens e a água (ENGELAND et al., 1996). A transmissão vertical (via congênita) também é importante nesta espécie animal (ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1997), havendo inclusive, estudos mais recentes que relatam a existência de uma linhagem, da raça Charollais, de ovinos mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* (MORLEY et al., 2005).

A alta prevalência da toxoplasmose em ovinos pode estar ligada a menor resistência desta espécie ao parasito e as próprias condições de exploração da ovinocultura que expõe estes animais a maior probabilidade de contato com os oocistos eliminados pelos felídeos (Dubey & Hamir, 2002). Estudos recentes relatam que idade, sexo, sistema de manejo, contato com felinos, suplementação mineral e tipo de alimentação estão relacionados a fatores de risco para infecção toxoplásmica em ovinos (NETO et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009; LOPES et al., 2010).

DUBEY et al. (1981), nos EUA, constataram em uma propriedade, ocorrência de 100% de ovinos positivos no teste de hemaglutinação indireta (HI), enquanto que uma ovelha com histórico de abortamentos há cinco meses, ainda apresentava titulação de 2048.

RHYAN & DUBEY (1984), também nos EUA, detectaram 11 animais positivos dos 12 amostrados, sendo que as ovelhas que tinham histórico de abortamento apresentaram titulações quatro vezes maiores que os demais. Em 1990, no mesmo

país, DUBEY e colaboradores, encontraram 83,3% de fetos abortados positivos, utilizando o teste de aglutinação modificada (MAT), para *T. gondii*.

As taxas de infecção apontadas para rebanhos ovinos no Brasil são variáveis (Tabela 1). Esta flutuação deve-se principalmente ao tipo de teste sorológico utilizado, à região e a idade dos animais estudados (DUBEY, 1990), além dos aspectos já abordados anteriormente.

Tabela 1. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em ovinos pertencentes a diversas regiões do Brasil.

Autores	Ano	Cidade/Estado	Reação sorológica	Número de ovinos	% de positivos
Amaral et al.,	1978	Bahia	HAI	100	23
Larsson et al.,	1980	Uruguaiana/RS	SF	100	39
Nishikawa et al.,	1986	Rio Grande do Sul	RIFI	310	8
Silva & Costa	1981	Guaíba/RS	AL	655	12
Meireles	2003	São Manuel/SP	RIFI	352	31
Langoni et al.,	1999	Estado de São Paulo	ELISA	200	55
Garcia et al.,	1999	Estado do Paraná	RIFI	228	52
Silva et al.,	2003	Estado do Pernambuco	RIFI	173	35
Cavalcante et al.,	2004	Rondônia	RIFI	141	47
Figliuolo et al.,	2004	Estado de São Paulo	RIFI	597	34
Neto et al.,	2008	Rio Grande do Norte	RIFI	366	31
Clementino et al.,	2009	Rio Grande do Norte	ELISA	102	29
Soares et al.,	2009	Rio Grande do Norte	RIFI	409	20
Pinheiro et al.,	2009	Estado de Alagoas	RIFI	432	33
Ueno et al.,	2009	Brasília	RIFI	1028	38
Lopes et al.,	2010	Jaboticabal/SP	RIFI	488	52

Convenções:

SF: Reação de Sabin & Feldman

HAI: Reação de Hemoaglutinação Indireta

AL: Aglutinação em Látex

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

ELISA: Ensaio Imunoenzimático

Dentre as vias de transmissão da toxoplasmose ao homem, epidemiologicamente, aquela que tem sido incriminada com maior frequência é a da veiculação de cistos por meio de produtos de origem animal, principalmente quando estes são ingeridos cru ou sem um tratamento térmico adequado (COOK, 2000). Na Europa, mais de 50% de carne de ovinos e suínos, pesquisada por ACHA & SZYFRES, (1986) apresentaram-se parasitadas pelo *T. gondii*.

Na década de 60 JACOBS & MOYLE, (1963) já apontavam, na França e Nova Zelândia, a carne ovina como a principal fonte de infecção toxoplásmica humana. Tais fatos podem ser extrapolados para algumas regiões brasileiras, bem como para determinados grupos étnicos de nosso país, em que o manuseio e o consumo de carne ou vísceras de ovinos são os responsáveis pela ocorrência desta enfermidade em pessoas (LARSON et al., 1980).

Prova disto foi um surto de toxoplasmose humana relatado na cidade de Bandeirantes, Estado do Paraná por BONAMETTI et al. (1997). Os autores apresentaram 17 casos (dentre estes uma paciente que estava no 5º mês de gestação) com sintomatologia aguda da doença, adquirida pela ingestão de carne crua de carneiro, servida em uma festa. Todos os paciente apresentaram títulos séricos de anticorpos específicos (IgM) que evidenciaram fase aguda da toxoplasmose, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Os enormes prejuízos ocasionados por esta enfermidade, aliados aos estudos relatados sobre soroprevalência e isolamento de parasitos viáveis em tecidos comestíveis, revelam a importância da toxoplasmose ovina como doença e como zoonose.

1.4 - Justificativa

SPENCE et al. (1978) inocularam *T. gondii* (cepa não descrita) em dois ovinos e detectaram sêmen infectado no 20º DPI de um dos animais e no 25º DPI do segundo ovino. Em um segundo experimento, *T. gondii* foi isolado de um dos ovinos de forma constante, do 7º ao 32º DPI. Do outro animal, estes autores conseguiram recuperar o agente somente em duas ocasiões (14º e 32º DPI).

Ainda em ovinos, TEALE et al. (1982) inocularam seis animais com 2000 cistos cada (cepa não mencionada), pela via subcutânea. A presença de *T. gondii* nas amostras seminais dos carneiros foi observada em três dos seis animais inoculados, em duas ocasiões para cada um dos ovinos (16° e 26° DPI). AGANGA et al. (1988), na Nigéria, num trabalho envolvendo inoculação de reprodutores ovinos (cepa TS-1), puderam recuperar *T. gondii* em amostras seminais colhidas no 21° DPI de todos os machos infectados.

No CPPAR/FCAVJ/UNESP, LOPES et al. (2009a) isolaram *T. gondii*, em diversas datas pós-inoculação, de amostras seminais de todos ovinos experimentalmente infectados com as cepas P (oocistos) e RH (taquizoítos), utilizando-se as técnicas bioprova e PCR (Figura 1A). Salienta-se que, além de todos reprodutores (inoculados) eliminarem no sêmen o *Toxoplasma*, foi possível, ainda, isolar este coccídio (bioprova, PCR e imunistoquímica, Figura 1B), dos fragmentos colhidos de testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata dos ovinos necropsiados.

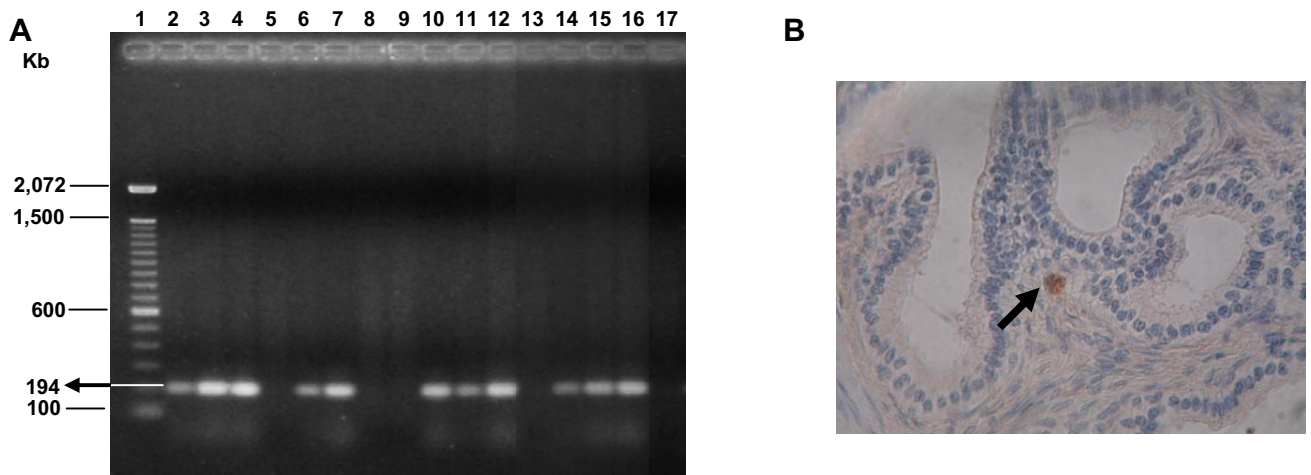


Figura 1. (A) Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras seminais dos ovinos experimentalmente infectados. (1) Marcador de peso molecular DNA Ladder (100bp). (2) Sêmen do ovino 02 (14 dias pós-inoculação). (3) Sêmen do ovino 09 (35 dias pós-inoculação). (4) Sêmen do ovino 02 (42 dias pós-inoculação). (5) Sêmen do ovino 16 (49 dias pós-inoculação). (6) Sêmen do ovino 09 (56 dias pós-inoculação). (7) Sêmen do ovino 02 (63 dias pós-inoculação). (8) Sêmen do ovino 09 (63 dias pós-inoculação). (9) Sêmen do ovino 07 (05 dias pós-inoculação). (10) Sêmen do ovino

52 (11 dias pós-inoculação). (11) Sêmen do ovino 48 (14 dias pós-inoculação). (12) Sêmen do ovino 52 (21 dias pós-inoculação). (13) Sêmen do ovino 52 (49 dias pós-inoculação). (14) Sêmen do ovino 52 (56 dias pós-inoculação). (15) Sêmen do ovino 07 (70 dias pós-inoculação). (16) Controle positivo. (17) Controle negativo. (B) Fotomicrografia da vesícula seminal demonstrando agrupamento de taquizoítos com imunoreatividade ao *Toxoplasma gondii*. Ovino inoculado com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Obj. 40x.

O isolamento de *T. gondii* no sêmen de animais domésticos foi comprovado com sucesso em ovinos (SPENCE et al., 1978; TEALE et al., 1982; AGANDA et al., 1988; LOPES et al., 2009a), caprinos (DUBEY e SHARMA, 1980; SANTANA 2007), suínos (MOURA et al., 2007), bovinos (SCARPELLI et al., 2009) e cães (ARANTES et al., 2009).

Resultados preliminares quanto ao isolamento deste protozoário de amostras seminais de ovinos, sugerem a possibilidade de este coccídio ser transmitido sexualmente. Entretanto, inexistem na literatura trabalhos que comprovem a transmissão sexual, por monta natural, de *T. gondii* na espécie ovina, o que justifica a realização deste projeto de pesquisa. A confirmação desta via de infecção poderá justificar, também, a elevada disseminação desta zoonose nesta espécie animal, responsável por enormes prejuízos à ovinocultura mundial.

2. - OBJETIVOS

Geral:

Comprovar a transmissão sexual do *Toxoplasma gondii* em ovelhas reprodutoras, sorologicamente negativas para toxoplasmose, submetidas à monta natural por machos infectados experimentalmente com oocistos ou taquizoítos deste coccídio, fato inédito na literatura consultada.

Específicos:

Machos:

Avaliar por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a resposta imune humoral dos reprodutores após a inoculação de *T. gondii*;

Pesquisar pelas técnicas da bioprova e da PCR, a presença de *T. gondii* em amostras de sêmen colhidas dos ovinos infectados experimentalmente

Fêmeas:

Avaliar clínica e laboratorialmente ovelhas, em idade reprodutiva, expostas à monta natural por reprodutores comprovadamente parasitados por *T. gondii*.

Pesquisar por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a resposta imune humoral das fêmeas pós-monta natural.

Investigar a possível presença de *T. gondii*, em diversos tecidos das reprodutoras pós-monta e em suas respectivas proles, por meio do bioensaio (inoculação em camundongos) e reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Após avaliação de todos os resultados serem obtidos, inferir sobre a ocorrência ou não da transmissão sexual de *T. gondii* na espécie ovina.

3. - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Cepas de *Toxoplasma gondii*

Foram utilizadas as cepas "P" (JAMRA & VIEIRA, 1991) e "RH" (SABIN, 1941), mantidas no "CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Campus de Jaboticabal. A cepa "P" produz infecções letais nos camundongos, se não medicados, experimentalmente infectados. Os sobreviventes à infecção normalmente apresentam razoável quantidade de cistos teciduais no cérebro.

3.2 - Obtenção de cistos cerebrais contendo bradizoítos de *Toxoplasma gondii*

Camundongos albinos suíços, fêmeas, com idade média de 35 dias foram inoculados intraperitonealmente com aproximadamente 10 cistos (cepa "P") cada, e observados diariamente até o 42^o dia pós-inoculação, quando, então, eram eutanasiados. Os camundongos inoculados foram medicados com sulfadiazina (500 mg) misturada à ração (100g) na dose de 3,5g/animal/dia de ração do segundo ao 11^o dia pós-inoculação de *T. gondii*. A maioria dos camundongos sobreviventes à infecção apresentavam cistos cerebrais.

Para pesquisa de cistos de *T. gondii* os camundongos foram eutanasiados e posicionados em decúbito esternal. Com o auxílio de pinça e tesoura, cada cérebro foi removido e transferido para um graal estéril e macerado com cerca de 1,0 ml de solução fisiológica estéril. Uma alíquota de 50 µl foi examinada ao microscópio óptico, com objetiva de 40X, para identificação e quantificação dos cistos de *T. gondii* eventualmente presentes. Nos camundongos que morreram antes do 11^o dia pós-inoculação, realizou-se pesquisa de taquizoítos no exsudato peritoneal. Os taquizoítos, assim obtidos, dependendo da concentração e viabilidade, foram também inoculados em outros camundongos com o objetivo de se obter cistos cerebrais.

3.3 - Obtenção de oocistos de *Toxoplasma gondii*

Para este estudo foram utilizados dois gatos, SRD (sem raça definida), entre dois e três meses de idade, sorologicamente negativos (RIFI) para a presença de *T. gondii*

(anticorpos e oocistos). Os animais receberam pela via oral aproximadamente 1500 e 800 cistos de *T. gondii* (cepa P), para o gato 1 e 2, respectivamente. Para a inoculação dos gatos, adotou-se a metodologia proposta por COSTA et al. (1977), tomando-se o cuidado de realizar a lavagem da seringa utilizada com solução fisiológica, a fim de remover os cistos que porventura estivessem aderidos às paredes da mesma. Além do macerado cerebral, os gatos receberam vísceras (pulmão, coração e fígado) e, ainda, a carcaça dos camundongos positivos para cistos, com o objetivo de aumentar o inóculo administrado.

Os felinos foram mantidos, isoladamente, em gaiolas metálicas. Os animais foram colocados em ambiente fechado, sendo a água e a ração fornecidas “*ad libitum*”. A cada 24 horas, os animais foram transferidos para novas gaiolas limpas e os comedouros e bebedouros trocados. Os papéis utilizados para forrar as gaiolas foram acondicionados em sacos de papel e incinerados. As gaiolas e o recinto (piso e paredes) ocupados pelos gatos infectados foram tratados com água quente (80°C).

Exames coproparasitológicos (Método de Sheather), utilizando-se do volume total de fezes excretadas durante 24 horas pelos gatos, foram realizados, diariamente, durante 15 dias consecutivos pós-inoculação. As fezes recentemente colhidas foram misturadas com água até a formação de uma massa pastosa. Uma solução de sacarose (500g de açúcar dissolvidas em 320mL de água destilada) foi adicionada na proporção 1:1 para homogeneização do material. Em seguida, este material foi filtrado para a remoção das partículas maiores e transferido para tubos cônicos de centrífuga de 50mL (Falcon). Do material, assim obtido, após centrifugação (3000 a 4000 rpm por 10 minutos), foram aspiradas alíquotas do sobrenadante, com auxílio de uma pipeta Pasteur, para a pesquisa de oocistos de *T. gondii* em microscópio óptico (objetiva de 40X). Em cada uma das amostras de oocistos, foi adicionado solução de ácido sulfúrico a 2% para auxiliar no processo de esporulação. Assim, o material colhido diariamente, foi mantido em temperatura ambiente em frasco parcialmente fechado e aerado mecanicamente duas vezes ao dia, durante 10 dias até a completa esporulação dos oocistos (DUBEY et al., 1972).

Os oocistos esporulados foram lavados em solução fisiológica, por meio de sucessivas centrifugações, para remoção do ácido sulfúrico 2% e estocados em temperatura de refrigeração (4°C a 8°C), imersos em solução salina a 0,85%.

A identificação dos oocistos esporulados foi realizada utilizando-se critérios morfológicos (ZAMAN, 1970), por meio da mensuração dos oocistos (10 a 12 micrômetros) com auxílio de uma objetiva micrométrica ocular (40X) em microscópio de luz e por meio de inoculações intraperitoneais em camundongos (DUBEY et al., 1972). Após a identificação, foi efetuada a quantificação total dos oocistos em cada uma das datas de emissão das fezes, para cada um dos dois felinos, por meio de cinco contagens em câmara de Neubauer, de acordo com a técnica descrita por COSTA et al. (1977).

Para a inoculação nos ovinos, procedeu-se uma mistura de todas as amostras fecais positivas, nos respectivos dias em que foram colhidas, para cada um dos felinos, resultando assim em duas soluções (oriundas dos dois felinos). Posteriormente, estas soluções foram novamente examinadas, sendo o tamanho do inóculo definido mediante contagem de oocistos em câmara de Neubauer.

3.4 - Obtenção de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Para a obtenção dos taquizoítos e padronização dos inóculos que posteriormente foram administrados aos ovinos, procedeu-se da seguinte forma: camundongos albinos suíços, fêmeas, com idade de 35 dias, receberam, por via subcutânea, exsudato (contendo *T. gondii*) colhidos de outros camundongos previamente inoculados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH. Frequentemente, alguns destes camundongos eram eutanasiados e posicionados em decúbito dorsal. Após o acesso à cavidade abdominal, foi feito um lavado intraperitoneal com injeção de 1,0 mL de solução fisiológica estéril e posterior aspiração deste conteúdo.

Com o auxílio de microscopia óptica (objetiva de 40X), a concentração, viabilidade e morfologia dos taquizoítos foram avaliadas para obtenção dos inóculos. A padronização desta metodologia permitiu a obtenção de taquizoítos, em concentrações variadas, presentes no exsudato intraperitoneal dos camundongos previamente infectados por *T. gondii* (LOPES, 2007).

3.5 - Confeção de lâminas com antígeno para RIFI

Para a realização da RIFI foi utilizado, como antígeno, taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, mantidos em solução salina estéril acrescida de heparina (25µl de heparina em 50 mL de solução salina), obtidos de camundongos no segundo dia pós-infecção, e inativados por formol a 0,5%, em estufa a 37°C por 30 minutos. Após centrifugação (um minuto a 500 rpm), para sedimentar impurezas, o sobrenadante recolhido foi novamente centrifugado (10 minutos a 1500 rpm), sendo descartado o novo sobrenadante. O sedimento foi então ressuspensão em PBS e centrifugado mais uma vez. Após nova ressuspensão do sedimento, o mesmo foi avaliado (microscopia óptica, objetiva de 40X) quanto à quantidade de taquizoítos e então diluído em PBS até obter-se uma média de 20 a 30 taquizoítos por campo. Dez microlitros desta suspensão de taquizoítos foram colocados em “poços” (imprensos em lâminas de microscopia pela técnica de “Silk Screen”). As lâminas contendo o antígeno foram mantidas à temperatura ambiente (“overnight”), cobertas para evitar contaminação por poeira, para secarem. Em seguida, as mesmas foram envoltas em papel alumínio e estocadas a -20°C até a utilização (LOPES, 2007).

PARTE I: MACHOS – (MATERIAL E MÉTODOS)

3.6 – Seleção dos ovinos machos reprodutores experimentais.

Três ovinos machos, sem raça definida, entre um e dois anos de idade, sorologicamente negativos para toxoplasmose, neosporose, brucelose e leptospirose, clinicamente saudáveis, em idade reprodutiva, foram selecionados de um total de 32 animais examinados, oriundos de propriedades rurais dos municípios paulistas de Pitanguerias, Morro Agudo e Jaboticabal.

Amostras de sangue dos animais foram colhidas por venopunção jugular, em tubos de *vacutainer*, sem anticoagulante. O material foi centrifugado a 2000 rpm, por 10 minutos, e os soros obtidos foram estocados a -20°C, até o processamento. A técnica sorológica empregada para detecção de anticorpos contra *T. gondii* foi a RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta (CAMARGO, 1964), utilizando-se de conjugado anti-IgG

específico para ovinos e caprinos (Sigma Chemical - F4891), marcado com isotiocianato de fluoresceína, sendo consideradas como amostras positivas os soros que apresentaram títulos iguais ou superiores a 64 (SOARES et al, 2009).

Empregou-se, também, a RIFI para detectar a presença de anticorpos contra *Neospora caninum* (CONRAD et al. 1993) sendo os soros dos animais usados nas diluições de 1:50 e 1:100. Os ovinos com títulos sorológicos a partir de 50, foram considerados positivos (FIGLIUOLO et al., 2004) e, conseqüentemente, descartados do experimento.

Para pesquisa de anticorpos contra brucelose foi utilizada a Técnica do Antígeno Acidificado Tamponado, também conhecida como Teste do Rosa Bengala ou “Card Test” (ALTON et al., 1988). Para este teste, 0,03 mL do soro foi colocado em contato com 0,03 mL do antígeno em placa de vidro huddleson. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e a placa mantida em movimentos rotatórios durante quatro minutos, para observar a ocorrência, ou não, de grumos de aglutinação, indicativos da soroconversão. Testou-se somente o antígeno *Brucela abortus*, em decorrência da impossibilidade de obtenção do antígeno referente a *Brucela canis*, não mais produzido pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Quanto à leptospirose, a técnica empregada foi a Prova de Soroaglutinação Microscópica. Os soros foram testados contra os sorovares *pomona*, *icterohaemorrhagiae* e *canicula*. O critério adotado para considerar um soro reagente foi de 50% de aglutinação no título final de 100, ou seja, metade das leptospiros aglutinadas no campo microscópico, observado no aumento de 100X. Para a realização da técnica e interpretação do grau de aglutinação foram adotadas as recomendações do CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1985).

Após a realização de todos os exames sorológicos, os animais selecionados foram alocados em boxes individuais descontaminados, pertencentes ao “Setor de Ovinos e Caprinos” do CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal da FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal. Posteriormente, estes animais foram desverminados, examinados clinicamente e submetidos à isolamento de 10 semanas para detecção de eventuais alterações clínicas e/ou laboratoriais que pudessem interferir nos resultados

experimentais. Durante o período de adaptação, pré-experimental, os ovinos receberam água, silagem de milho e ração “*ad libitum*”.

3.7- Condicionamento dos ovinos reprodutores à colheita de sêmen

Durante esta fase pré-experimental, os animais foram submetidos à colheita de sêmen pelo método artificial, com o uso de eletro-ejaculador, a cada sete dias, por um período de dez semanas, para obtenção de sêmen e, conseqüentemente, para que estivessem aptos a doarem sêmen no decorrer do experimento

3.8 - Inoculação dos ovinos reprodutores machos

Após o período de adaptação, os animais foram identificados, sorteados e distribuídos aleatoriamente em grupos, conforme o delineamento experimental descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Delineamento experimental dos machos reprodutores.

Grupo	Nº do ovino	Inóculo de <i>Toxoplasma gondii</i>		Solução salina*	Via de inoculação
		Oocistos	Taquizoítos		
1	1224	2x 10 ⁵	-	-	Oral
2	1234	-	1 x 10 ⁶	-	Subcutânea
3	546	-	-	100mL	Oral

*Solução fisiológica estéril de 0,9% de NaCl (controle).

Após a padronização dos diferentes inóculos, os oocistos foram administrados por meio de seringa acoplada a uma sonda de metal, para deposição direta no esôfago dos animais. Em seguida a inoculação dos oocistos, foram administrados mais 100 mL de solução fisiológica estéril em cada animal, para lavagem das paredes da seringa e/ou sonda, onde eventualmente os oocistos pudessem estar aderidos.

Os taquizoítos foram administrados pela via subcutânea, na linha média lateral do lado esquerdo do pescoço, utilizando-se seringas e agulhas estéreis conforme

descrito por BRESCIANI (2003). Posteriormente, um animal foi inoculado com 100 mL de solução fisiológica estéril (0,9% de NaCl), por via oral, constituindo, assim, o grupo controle.

Todos os animais foram mantidos isolados, em baias individuais, no Setor de Ovinos e Caprinos – CPPAR, durante todo o período experimental. Exames sorológicos para a detecção de anticorpos contra outras doenças infecciosas que pudessem provocar desordens reprodutivas, (brucelose, neosporose e leptospirose) também foram realizados em todos os ovinos experimentais, pré e pós-inoculação.

As fezes e a baia do ovino inoculado com oocistos foram diariamente lavadas com água à 80° C por 15 dias consecutivos após a infecção, para a destruição dos possíveis oocistos eventualmente presentes nos dejetos e nas instalações do animal experimental.

3.9 – Exames clínicos e laboratoriais dos machos

3.9.1 – Parâmetros clínicos

Durante o período experimental (pós-inoculação), os reprodutores foram submetidos a exames clínicos (aferição das frequências cardíaca e respiratória e da temperatura retal), um dia antes da infecção e a cada três até o 14º dia pós-inoculação (DPI). A partir desta data, tais exames foram realizados com intervalo de sete dias até o 70ºDPI.

3.9.2 – Resposta Imune-humoral dos machos

Nos soros dos dois ovinos reprodutores infectados experimentalmente e do pertencente ao grupo controle, obtidos nos dias -30, -15, -7, -1 e zero (antes da inoculação), dias anteriores à inoculação, e nos dias 3, 5, 7, 11, 14 após a infecção e, semanalmente, até o 70º DPI foram pesquisados anticorpos contra *T.gondii* por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo CAMARGO (1964).

A colheita de sangue foi feita por meio de punção da veia jugular com agulha 40 x 12 mm. Foram colhidos aproximadamente 10 mL de sangue sem anticoagulante de cada animal. Este material foi processado para obtenção do soro, sendo centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. O soro foi retirado com auxílio de pipeta de vidro e

acondicionado em microtubos previamente autoclavados, e mantidos sob congelação (-20°C).

Os soros dos ovinos foram diluídos em PBS (1:64 até 1:4096). A diluição de 16 microlitros de cada diluição de cada soro, foram depositados nos poços das lâminas contendo o antígeno. As lâminas, assim preparadas, foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas a 37°C por 40 minutos. Em seguida, estas lâminas foram lavadas três vezes (em tampão PBS, 10 minutos cada vez) e colocadas para secarem (seis minutos em estufa a 37°C). Posteriormente, adicionou-se o conjugado gamaglobulina anti-IgG total de ovino marcado com isotiocianato de fluoresceína, e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida (37°C por 40 minutos) em estufa. Nova lavagem por duas vezes foi procedida com tampão PBS e uma vez com água bidestilada (10 minutos cada lavagem) para remoção do excesso de sais. Após a secagem definitiva das lâminas, glicerina tamponada foi adicionada às mesmas, recobertas com lamínulas e examinadas em microscópio de fluorescência (objetiva de 40X).

3.10 – Exames no sêmen dos ovinos infectados experimentalmente por *Toxoplasma gondii*

3.10.1 – Colheitas do sêmen

Nos dias -1, 3, 5, 7, 11, 14 e semanalmente até o 70º DPI, amostras de sêmen foram obtidas dos três ovinos, inoculados ou não, pelo método artificial, com o uso de eletro-ejaculador. Os dias em que os reprodutores realizaram a monta natural nas respectivas fêmeas, a colheita do sêmen foi realizada antes da monta. Os ejaculados foram recolhidos em tubos graduados acoplados a funis plásticos previamente esterilizados. Estes foram mantidos a 37°C e, no momento da colheita, acoplados a um recipiente aquecido para evitar o choque térmico, que poderia ocasionar mortalidade dos espermatozoides e alterações morfológicas (MAIA, 1998).

Imediatamente após a ejaculação, o tubo contendo o sêmen foi colocado em banho-maria (37°C) para garantir a integridade espermática.

3.10.2 - Parâmetros espermáticos

3.10.2.1- Motilidade e Vigor

Para avaliação da motilidade (expressa em % de espermatozóides que se movimentam em trajetória retilínea e para frente) e do vigor (intensidade com que esta motilidade é exercida), imediatamente após a colheita, uma alíquota do sêmen (aproximadamente 10 μ L) foi colocada sobre lâmina e recoberta por lamínula (previamente aquecidas a 37°C) e observada ao microscópio óptico (aumentos de 10 e 40X). Os dados foram expressos em porcentagem (motilidade), numa escala de 0 a 5 (vigor), e anotados em fichas próprias para posterior análise (MIES FILHO et al., 1992).

3.10.2.2 - Concentração e volume

Para análise da concentração espermática foram obtidas alíquotas de 5 μ L, diluídas em 4.995 μ L de solução salina formol. A concentração foi estimada por meio da contagem em câmara de Neubauer, conforme MAIA (1998). O volume seminal foi mensurado por meio da observação direta dos tubos graduados.

3.10.2.3 - Morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática foram obtidas alíquotas de 50 μ L, diluídas em 1 mL de solução salina formol (0,9%). A morfologia seminal, para evidenciar possíveis patologias espermáticas, foi realizada de acordo com critérios padronizados por BLOM (1973), utilizando-se de microscopia de contraste de fase, conforme descrito por (MIES FILHO et al., 1992).

3.11 – Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos ovinos pelo bioensaio

O isolamento de *T. gondii* das amostras de sêmen colhidas foi realizado conforme metodologia proposta por TEALE et al. (1982). Em uma alíquota de 0,8 mL de cada amostra de sêmen foi acrescido solução tampão (PBS), com pH de 7,2, autoclavado e acrescido de antibiótico. Cinco camundongos foram posteriormente inoculados, via intraperitoneal, com 0,3 mL/camundongo da alíquota espermática diluída. Os camundongos foram observados e examinados conforme metodologia adotada por LOPES (2007).

3.12 – Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos ovinos pela PCR

A outra parte da alíquota espermática ($\pm 0,8$ mL não diluída) de cada amostra de sêmen foi devidamente armazenada (-20° C) para posterior análise pela técnica de PCR (FUENTS et al., 1996).

3.12.1 - Extração do DNA das amostras do controle positivo e das amostras de sêmen e tecidos do ovinos machos reprodutores

Todas as amostras de sêmen, positivas para a presença de *T. gondii* pelo bioensaio, obtidas ao longo do experimento, e o “pool” de tecidos dos três ovinos foram avaliadas quanto à presença do *T. gondii* pela técnica de PCR.

O DNA das amostras do controle positivo, do sêmen e tecidos foi extraído segundo metodologia preconizada por SAMBROOK & RUSSELL (2001).

Uma alíquota de 100 μ L (controle positivo, sêmen e tecido) previamente preparado para a extração de DNA, foi transferida para um microtubo de 1500 μ L. A esta, foram acrescentados 900 μ L de tampão PBS, pH 7,2, previamente autoclavado. Após homogeneização, o material foi então centrifugado (8000 rpm por 6 min) para lavagem, sendo o sobrenadante removido por inversão. Ao sedimento, foram acrescentados 100 μ L de PBS e 400 μ L da solução de lise (2% β -mercaptoetanol, 10 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS e 100 mM de NaCl). Após agitação em vortex, a amostra foi incubada em banho Maria (37° C) por 30 minutos. Foram então adicionados 5 μ L de Proteinase K (200 μ g/mL) e nova incubação em banho Maria (37° C por 12 a 16 horas). Na seqüência, foram realizadas duas extrações de DNA com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Em seguida, foram acrescentados 10% do volume de uma solução de Acetato de Sódio para precipitação do DNA. Na seqüência, foi adicionado etanol 100%, gelado (duas vezes o volume). O material foi então agitado levemente com movimentos manuais até a formação da “medusa” de DNA. Em seguida, o material foi centrifugado (12000-16000 rpm por 20 min), o sobrenadante descartado por inversão e 900 μ L de etanol 70% foram acrescentados. O DNA precipitado foi submetido à agitação (vortex) para se desprender o pellet. Nova centrifugação (12000-16000 rpm por 20 min) e o sobrenadante foi desprezado por inversão e o tubo contendo o DNA foi deixado a secar de boca para baixo em papel absorvente. O DNA foi ressuspenso em 50 μ L de

água miliQ autoclavada e mantido em temperatura ambiente “overnight” para, em seguida, ser estocado sob temperatura de congelamento (-20°C) até realização da PCR.

A quantificação do DNA foi realizada por meio de espectrofotometria em absorvância de 260nm e corrida eletroforética, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, de 5µL do DNA previamente extraído. Foi utilizado o padrão de peso molecular λ (50ng/10µL) e, por comparação visual, a quantidade de DNA foi estimada.

3.12.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a detecção do DNA de *T. gondii* nas amostras de sêmen e tecidos analisadas, foi amplificado um fragmento do gene B₁ de *T. gondii* de 194 pares de bases (bp) utilizando-se os “primers” 5’-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3’ (B₁) e 5’TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC -3’ (B₂), descritos por BURG et al. (1989) e FUENTES et al. (1996). A reação de polimerização em Cadeia (*Polimerase Chain Reaction*) SAIKI et al. (1988) foi feita pela adição de 500ng de DNA molde em um meio de reação contendo MgCl₂ 2mM, KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH 9, Triton X-100 0,01%, dNTPs 0,2mM, 10pmoles de iniciador e 5,0 unidades de *Taq*DNA polimerase.

Tabela 3. Protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR):

CICLO	TEMPO	TEMPERATURA (°C)
1	2 minutos	95
2	1 minuto	95
3	30 segundos	55
4	1 minuto	72
5	35 vezes (passo 2 a 4)	-
6	7 minutos	72
7	-	4

As reações foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler gradient® (Eppendorf).

3.12.3 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados na PCR

A análise dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão de TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 0,1 mM). As eletroforeses foram realizadas neste mesmo tampão à temperatura ambiente. Géis de agarose contendo fragmentos de restrição separados por eletroforese foram corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL em água por 20 minutos e observados em trans-iluminador UV.

3.13 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* em testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata dos ovinos machos reprodutores

3.13.1 – Exames anátomo-histopatológicos dos machos

No 78º DPI, os animais foram necropsiados para realização de exames anátomo-histopatológicos dos ovinos, inclusive o do grupo controle. Amostras de testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata foram colhidas para exames histopatológicos e para isolamento de *T. gondii* por meio da técnica da bioprova e PCR. Para exames histopatológicos, o material colhido foi fixado em formol tamponado a 10%, por um período de 24 horas, sendo então transferido para uma solução de álcool 70%. Em seguida o material foi emblocado em parafina histológica e armazenado desta forma até a realização dos exames.

3.13.2 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* nos tecidos do sistema reprodutor dos machos pelo bioensaio

O bioensaio de amostras de testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata colhidas, inclusive do grupo controle, foi realizado de acordo com o protocolo descrito por DUBEY (1998). Os tecidos foram primeiramente cortados em pequenos fragmentos (2 x 2cm), sendo removidos o tecido conectivo e a gordura. A vesícula seminal e a próstata foram utilizadas integralmente, enquanto que o testículo e epidídimo foram utilizados para completar 100g de tecidos. O “pool” de tecidos foi homogeneizado com

cinco volumes de NaCl 0,15M (salina) sendo usado um homogenizador de uso doméstico.

A este material homogeneizado adicionou-se o mesmo volume de uma solução de pepsina ácida, pH 1,1 – 1,2 (pepsina, 2,6g; HCl, 7,0mL; água destilada suficiente para 500mL de solução), recém preparada e aquecida em banho-maria a 37°C. A mistura foi incubada em estufa a 37°C por uma hora sobre agitador magnético.

Após a incubação, a suspensão foi coada por meio de duas camadas de gaze, o coado transferido para cinco tubos cônicos de 50mL e centrifugado a 1.200g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de cada tubo foi então neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio a 1,2%, pH 8,3, recém-preparado (ao redor de 5,0mL por tubo). A neutralização foi percebida visualmente pela mudança de cor do sedimento. Após homogeneização, o material foi transferido para um único tubo cônico, completando-se o volume para 50mL com salina, e centrifugado a 1.200g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado com salina (v/v) contendo 2000UI de penicilina e 200ug de estreptomicina por mililitro.

Imediatamente cada amostra de cada animal foi inoculada em grupo de 15 camundongos.

Esses camundongos inoculados (1mL/camundongo) foram observados diariamente, por seis semanas (COSTA et al., 1977), para a avaliação da presença de sinais clínicos da toxoplasmose. Naqueles que apresentaram pêlos eriçados e/ou aumento de volume abdominal durante este período, foi pesquisada a presença de taquizoítos de *T. gondii* no exsudato peritoneal e “imprint” de pulmão. Os sobreviventes foram exsanguinados para pesquisa de anticorpos (RIFI - CAMARGO, 1964) e cistos cerebrais de *T. gondii*, em amostras de soros e cérebros dos camundongos, respectivamente.

3.13.3 - Pesquisa do DNA de *Toxoplasma gondii* nos tecidos dos ovinos machos pela PCR

Um “pool” dos respectivos tecidos (testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata) dos ovinos reprodutores (inoculados e controle) foi colhido conforme item

3.13.2, e devidamente armazenados para posterior processamento da técnica de PCR conforme item 3.12.2.

PARTE II: OVELHAS – (MATERIAL E MÉTODOS)

3.14 – Seleção das ovelhas reprodutoras para a realização da Monta Natural

Doze ovelhas em idade reprodutiva, sorologicamente negativas para toxoplasmose, neosporose, brucelose e leptospirose, clinicamente saudáveis, foram selecionadas de um total de 67 animais examinados oriundos da região de Jaboticabal, SP. As técnicas sorológicas utilizadas para detecção de ovelhas positivas para as doenças anteriormente citadas, foram realizadas conforme metodologias descritas para os machos no item 3.6.

3.15 – Adaptação das ovelhas reprodutoras ao manejo empregado

Após a realização de todos os exames sorológicos, as 12 ovelhas selecionadas foram alocadas, distante dos machos, em boxes individuais descontaminados, pertencentes ao “Setor de Ovinos e Caprinos” do CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal da FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal. Posteriormente, todas as fêmeas foram desverminadas, examinadas clinicamente e submetidas a quarentena (12 semanas) para detecção de eventuais alterações clínicas e/ou laboratoriais que pudessem interferir nos resultados experimentais. Durante o período de adaptação pré-experimental (90 dias), as ovelhas reprodutoras receberam água, silagem de milho e ração “*ad libitum*”.

Durante esta fase, pré-experimental, as fêmeas foram submetidas a cada sete dias a exames clínicos (frequências cardíaca, respiratória e temperatura retal), objetivando descartar aquelas que eventualmente, ainda, não estivessem adaptadas ao sistema de manejo empregado. Uma vez por semana, todas as fêmeas eram expostas visualmente aos machos objetivando o estímulo sexual.

3.16 – Delineamento experimental para realização da monta natural nas ovelhas submetidas à monta natural pelos machos não inoculado (controle) ou experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*.

Com o objetivo de avaliar a eventual transmissão sexual do *T. gondii* por meio da monta natural, utilizando ovinos machos experimentalmente infectados, as 12 reprodutoras previamente randomizadas, com base no peso corporal, foram identificadas, e aleatoriamente distribuídas aos grupos, conforme o delineamento expresso na Tabela 4.

Tabela 4. Delineamento experimental das ovelhas submetidas à monta natural por carneiros inoculados com *Toxoplasma gondii* e não infectado.

Grupo	Número das ovelhas submetidas à monta natural pelos respectivos reprodutores infectados ou não por <i>Toxoplasma gondii</i>		
	machos infectados		macho não infectado
	2,5 x 10 ⁵ oocistos	1,0 x 10 ⁶ taquizoítos	100 mL solução salina
1	66	--	--
	5	--	--
	239	--	--
	4	--	--
	184	--	--
2	--	10	--
	--	6	--
	--	22	--
	--	238	--
	--	161	--
3	--	--	16
	--	--	58

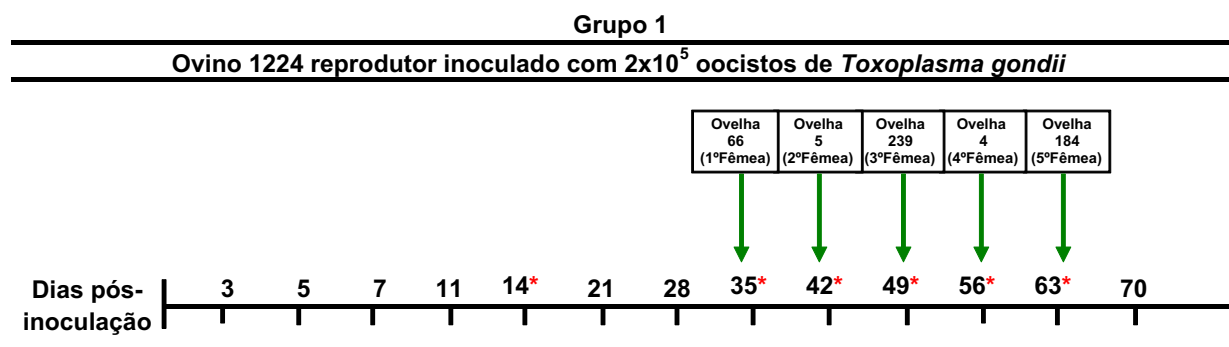
Exames sorológicos para a detecção de anticorpos contra outras doenças infecciosas que possam provocar desordens reprodutivas (brucelose, neosporose e

leptospirose) foram realizados, semelhantemente aos machos, em todas ovelhas experimentais (pré e pós-inoculação).

3.17 – Determinação dos dias pós-inoculação em que os reprodutores inoculados com *Toxoplasma gondii* e não infectado (controle), realizaram a monta natural das fêmeas selecionadas

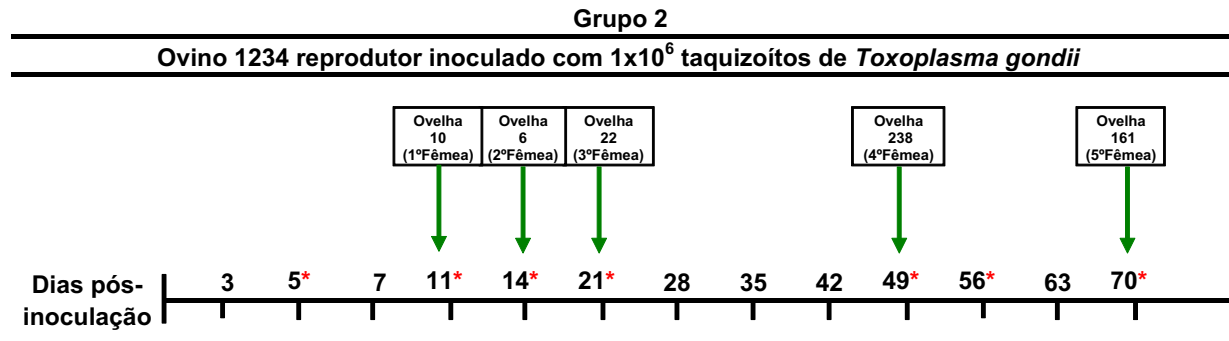
Para determinar os dias em que as fêmeas foram expostas à monta natural pelos reprodutores experimentalmente infectados com *T. gondii*, utilizou-se resultados prévios obtidos por LOPES et al. (2009a). Estes autores registraram, por meio da bioprova e PCR, o período de eliminação de *T. gondii* no sêmen de reprodutores ovinos experimentalmente infectados com oocistos (cepa "P") e taquizoítos (cepa "RH"). Com base nos resultados obtidos pelos autores anteriormente citados, as fêmeas selecionadas foram sincronizadas e montadas pelos reprodutores experimentalmente infectados com *T. gondii*, exatamente nos dias em que comprovou-se a eliminação de *T. gondii* pelo sêmen. As Tabelas 5, 6 e 7 ilustram os delineamentos experimentais propostos.

Tabela 5. Determinação dos dias pós-inoculação em que o reprodutor infectado com $2,0 \times 10^5$ oocistos de *Toxoplasma gondii*, realizou a monta natural nas fêmeas selecionadas.



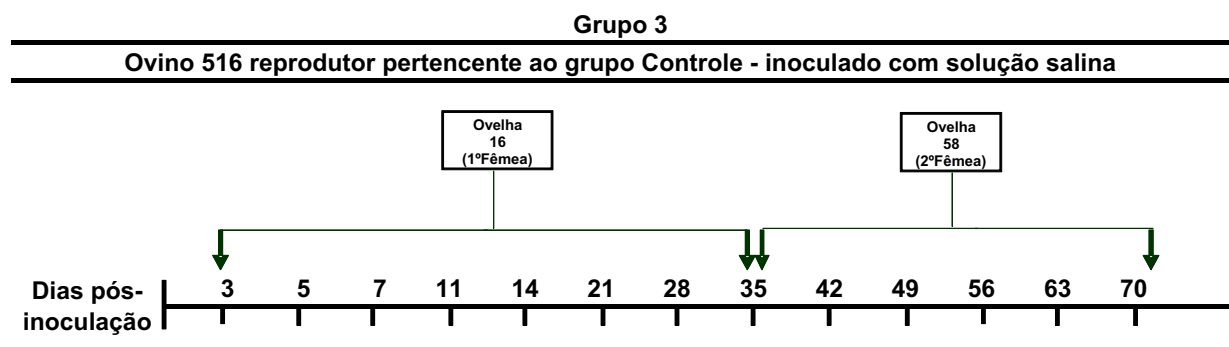
* Presença de cistos cerebrais em camundongos inoculados com amostras seminais de ovinos inoculados com oocistos da cepa "P" de *T. gondii* (LOPES et al., 2009a)

Tabela 6. Determinação dos dias pós-inoculação em que o reprodutor infectado com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, realizou a monta natural nas fêmeas selecionadas.



* Presença de cistos cerebrais em camundongos inoculados com amostras seminais de ovinos inoculados com taquizoítos da cepa "RH" de *T. gondii* (LOPES et al., 2009a)

Tabela 7. Determinação dos dias pós-inoculação em que o reprodutor não infectado (controle), realizou a monta natural nas fêmeas selecionadas.



3.18 – Programa de sincronização do estro utilizado nas ovelhas reprodutoras

A manifestação de estro nas ovelhas reprodutoras foi induzida por meio da aplicação de hormônios (norgestomet e gonadotrofina sérica eqüina), conforme o protocolo descrito por MAIA (1998) modificado (Figura 2). No dia zero, colocou-se, por meio de um aplicador, o implante auricular contendo 1,5mg de norgestomet, um progestágeno sintético. Tal hormônio promoveu uma liberação homogênea de progesterona, o que impedia as fêmeas tratadas de ovular durante este período. Este progestágeno foi retirado no 14º dia após a sua aplicação, fazendo com que o bloqueio da ovulação cessa-se bruscamente e as fêmeas entrassem numa fase folicular que

daria lugar ao cio e à ovulação. Concomitantemente à retirada do implante auricular, cada ovelha recebeu, pela via intramuscular, 200UI de gonadotrofina sérica eqüina (ECG), um liberador de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante).



Figura 2. Protocolo de sincronização com norgestomet e gonadotrofina sérica eqüina.

3.19 - Exames clínicos e laboratoriais nas ovelhas reprodutoras

3.19.1 - Parâmetros clínicos

Todas as ovelhas foram submetidas a exames clínicos (frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal), durante o período de adaptação e a cada três dias até o 14º dia pós-monta natural (DPMN). A partir desta data, tais exames foram realizados a cada sete dias, até o final da gestação de cada fêmea.

3.19.2 – Resposta imune humoral das fêmeas

Nos soros de todas as ovelhas, obtidos nos dias -30,-15,-7, -1, zero (antes da monta natural) 1, 3, 5, 7, 11, 14 e, semanalmente, até o final do período gestacional, foi pesquisada a presença de anticorpos específicos contra *T. gondii* pela RIFI (CAMARGO, 1964).

3.19.3 – Determinação da parasitemia nas ovelhas

Nas amostras de sangue colhidas na mesma periodicidade do item anterior, foram determinados os surtos parasitêmicos por meio da inoculação de camadas leucocitárias em camundongos. Para tal, amostras de sangue (10 mL) das ovelhas foram colhidas em tubo estéril contendo EDTA, nas mesmas datas dos exames clínicos. Após centrifugação (1000 g por 10 minutos), a camada leucocitária foi cuidadosamente

aspirada com auxílio de pipeta e inoculada, intraperitonealmente, em grupos de cinco camundongos. Esses camundongos foram observados por 15 minutos após as inoculações para avaliar possíveis efeitos adversos à inoculação. Em seguida, avaliações diárias foram efetuadas até 42 dias pós-inoculação, para verificação de manifestações decorrentes de infecção toxoplásmica.

Nos animais que apresentaram aumento de volume abdominal ou que morreram até o 10º DPI, foi pesquisada a presença de taquizoítos de *T. gondii* por meio da microscopia do exsudato peritoneal e “imprint” de pulmão dos mesmos. Nos camundongos que morreram a partir do 11º até o 42º DPI, realizou-se a pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* (RIFI) para posterior pesquisa de cistos (bradizoítos) de *T. gondii* (CAMARGO, 1964).

3.20 - Resposta imune humoral dos filhotes

Nos soros de todos os filhotes obtidos imediatamente após o parto (antes que os cordeiros ingerissem o colostro) e no 10º dia de vida destes animais (antes da necrópsia), pesquisou-se a presença de anticorpos específicos contra *T. gondii* pela RIFI (CAMARGO, 1964).

3.21 – Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos das ovelhas e em seus respectivos filhotes

3.21.1 - Exames histopatológicos, bioensaio e PCR.

Dez dias após o parto de cada ovelha, as mesmas foram necropsiadas sendo colhidas amostras dos seguintes segmentos: musculatura esquelética e cardíaca, cérebro/cerebelo, retina, baço, fígado, útero, vagina, ovário e placenta. Tentativas de isolamento de *T. gondii* foram realizadas por meio da histopatologia (DA SILVA & LANGONI, 2001), bioprova (DUBEY, 1998 – descrito no item 3.11) e PCR (FUENTES et al., 1996 descrito nos item 3.12.1, 3.12.2 e 3.12.3).

Nos filhotes com 10 dias de idade, resultantes de desordens reprodutivas (macerados de fetos abortados, natimortos e/ou filhotes mortos após o nascimento) ou não, foi pesquisado parasitismo tissular por *T. gondii* (BUENO et al., 2004 e BUXTON et al., 2006), utilizando-se a histopatologia (DA SILVA & LANGONI, 2001), o bioensaio em

camundongos (DUBEY, 1998 – descrito no ítem 3.11), e a técnica de PCR (FUENTS et al., 1996 descrito nos ítem 3.12.1, 3.12.2 e 3.12.3), a fim de confirmar ou não a transmissão vertical de *T. gondii*, oriunda da transmissão sexual. Convém salientar que para a execução desta última técnica, nos filhotes, foi utilizado o “pool” de tecidos, de filhotes positivos ou não para *T. gondii*, de todos os filhotes/fêmea.

Para realização dos exames histopatológicos, o material colhido foi fixado em formol tamponado a 10%, por um período de 24 horas, sendo então transferido para uma solução de álcool 70%. Em seguida o material foi embocado em parafina histológica e armazenado desta forma até a realização dos exames.

4. - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os valores dos parâmetros clínicos e seminais dos machos, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, considerando a colheita dos dados para cada dia experimental como repetições e, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 95% de confiança.

Os dados das fêmeas (parâmetros clínicos) foram analisados em um esquema fatorial em parcelas subdivididas pelo procedimento Proc Mixed do pacote estatísticos SAS, (2001) e as confrontações dos tratamentos foram obtidas pelo teste Tukey-kramer a 95% de confiança.

5 - RESULTADOS

5.1- Obtenção de cistos cerebrais contendo bradizoítos de *Toxoplasma gondii*

Dos 20 camundongos eutanasiados, foi possível quantificar aproximadamente 2.300 cistos cerebrais de *T. gondii*.

5.2 - Obtenção de oocistos de *Toxoplasma gondii*

Do primeiro gato inoculado, via oral, com 1500 cistos cerebrais de *T.gondii*, foi possível recolher de suas fezes aproximadamente $1,0 \times 10^6$ oocistos (Tabela 8) após somatória dos valores individuais, encontrados do quarto (D + 4) até o nono dia (D + 9) pós-inoculação. O pico de eliminação ocorreu no quarto dia, obtendo-se 484.375 oocistos esporulados.

Do segundo gato, inoculado com aproximadamente 800 cistos de *T. gondii*, foi possível recolher um total de 612.500 oocistos (Tabela 8) eliminados em três dias (5º, 6º e 7º DPI), ocorrendo o pico de liberação (340.625) no sexto dia pós-inoculação.

Os oocistos produzidos, após a esporulação, foram identificados como de *T. gondii* por meio de critérios morfológicos (ZAMAN, 1970) e pela infectividade utilizando-se inoculação intraperitoneal em camundongos (2.500 oocistos por animal, totalizando 15 camundongos). Tais camundongos vieram a óbito entre o 10º e o 12º dia pós-inoculação. No lavado peritoneal de 12 (80,0%) camundongos, que vieram a óbito, foram encontrados taquizoítos viáveis em quantidades variadas. Os camundongos sobreviventes, após seis semanas de inoculação, apresentavam de cistos cerebrais de *T.gondii*.

Tabela 8. Número de oocistos eliminados por gatos experimentalmente infectados com cistos da cepa "P" de *Toxoplasma gondii*.

Número do gato	Dias pós-inoculação/Número de oocistos											Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
5*	0	0	0	484.375	375.000	9.375	112.500	34.375	31.250	0	0	1.046.875
6**	0	0	0	0	268.750	340.625	3125	0	0	0	0	612.500

* Gato inoculado com aproximadamente 1.500 cistos da cepa "P" de *Toxoplasma gondii*

** Gato inoculado com aproximadamente 800 cistos da cepa "P" de *Toxoplasma gondii*

5.3 - Obtenção de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Após padronização da técnica para manutenção da cepa “RH” de *T.gondii* em camundongos, foi possível obter de lavados peritoneais de dois camundongos, 2.300 000 taquizoítos. Em seguida, os mesmos foram padronizados e imediatamente inoculados nos reprodutores.

PARTE I: MACHOS – (RESULTADOS)

5.4 - Seleção dos ovinos machos reprodutores experimentais

Pelos resultados dos exames sorológicos realizados em 32 ovinos machos, relativos à presença de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella abortus* e *Leptospira sorovares pomona, icterohaemorrhagiae* e *canicula*, foi possível selecionar três ovinos, reprodutores, negativos para os quatro patógenos supracitados. Estes resultados sorológicos encontram-se sumariados na Tabela 9.

Tabela 9. Anticorpos contra infecção por *Toxoplasma*, *Neospora*, *Brucela* e *Leptospira* dos ovinos examinados para seleção e formação dos grupos experimentais.

Número do ovino	Agente etiológico			
	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Neospora caninum</i>	<i>Brucela abortus</i>	<i>Leptospira</i> spp.
12611	+	-	+	-
1224	-	-	-	-
12390	+	-	-	+
263	+	-	-	+
515	+	-	-	-
609	+	+	-	+
387	+	-	-	-
864	+	-	-	-
267	-	-	-	+
12236	-	-	-	+
12868	+	-	-	+
261	+	+	-	+
507	-	-	-	-
1234	-	-	-	-
447	-	-	-	+
12647	+	-	-	-
789	+	+	-	+
602	+	-	-	-
542	-	-	-	+
640	+	-	-	+
12617	+	-	-	-
527	+	+	-	+
867	-	-	+	-
480	+	+	-	+
396	-	-	-	+
484	+	+	-	-
12397	-	+	-	-
593	+	-	+	+
445	-	-	-	-
546	-	-	-	-
12624	-	-	-	-
12619	+	+	-	+

5.5 - Condicionamento dos ovinos à colheita de sêmen

Durante esta fase pré-experimental, os três ovinos reprodutores foram submetidos à colheita de sêmen pelo método artificial, com o uso de eletro-ejaculador, a cada sete dias, por um período de cinco semanas, para obtenção de sêmen e, conseqüentemente, para que estivessem aptos a doarem sêmen no decorrer do

experimento. Convém salientar que todas amostras seminais dos ovinos, obtidas neste período, apresentaram volume, motilidade, vigor e concentração compatíveis com a espécie (MAIA, 1998).

5.6 - Exames clínicos dos machos

5.6.1 - Parâmetros clínicos (pré-inoculação)

Durante o período pré-experimental, período de maturação sexual e de treinamento dos machos para as colheitas de sêmen, as eventuais alterações, nos parâmetros de normalidade como descrito por MAIA (1998), observadas nas freqüências cardíaca e respiratória, além da temperatura corporal ocorreram esporadicamente, o que pode estar relacionado com o estresse dos ovinos submetidos ao manejo supracitado (Tabela 10).

Na Tabela 10 e Figura 3 estão registrados os dados clínicos (temperatura corporal, freqüências cardíaca e respiratória, respectivamente) dos animais, obtidos durante o período de adaptação (pré-inoculação).

Tabela 10. Temperaturas retais, frequências cardíaca e respiratória mensuradas nos ovinos selecionados durante o período pré-inoculação.

Número do Ovino	Parâmetro Avaliado	Temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória/Dias pré-inoculação											
		-70	-63	-56	-49	-42	-35	-28	-21	-14	-7	-3	
546	Temperatura retal	38,8	41	38,1	38	38,2	38,3	38,7	37,7	38,1	38,3	38,6	
1224		38	38,2	40,1	38	38,2	38,8	38,1	38,3	38,6	38	38,2	
1234		38,1	38,3	38,6	38,9	38,7	38,8	39,3	38	38,2	38,4	38,8	
	Média	38,30	39,17	38,93	38,30	38,37	38,63	38,70	38,00	38,30	38,23	38,53	
546	Frequência cardíaca	116	124	110	100	125	104	112	120	115	120	120	
1224		112	104	120	116	128	128	120	100	125	104	124	
1234		104	115	105	100	125	104	120	98	100	112	120	
	Média	110,67	114,33	111,67	105,33	126,00	112,00	117,33	106,00	113,33	112,00	121,33	
546	Frequência respiratória	26	36	36	24	40	36	48	24	32	56	32	
1224		28	24	32	56	28	26	24	32	56	24	24	
1234		24	24	36	24	40	36	56	24	32	60	28	
	Média	26,00	28,00	34,67	34,67	36,00	32,67	42,67	26,67	40,00	46,67	28,00	

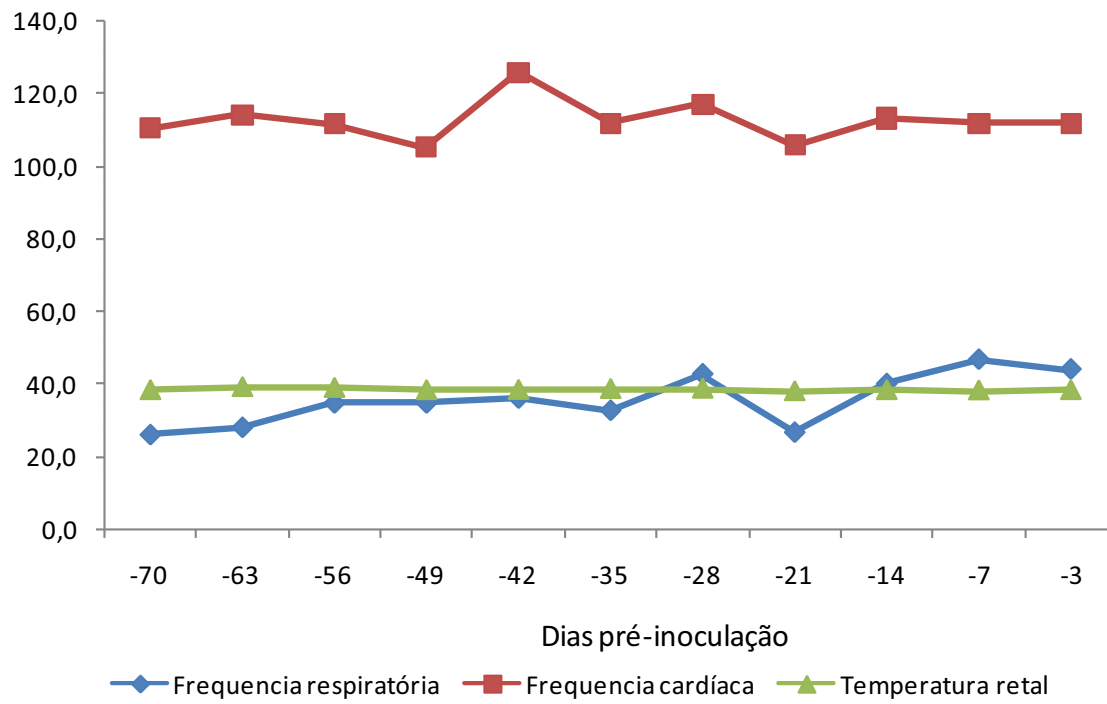


Figura 3. Média das temperaturas retais, freqüências cardíacas e respiratórias mensuradas nos carneiros reprodutores durante o período pré-inoculação.

5.6.2 – Parâmetros clínicos (pós-inoculação)

5.6.2.1 - Temperatura corporal

A temperatura corporal (retal) média do ovino pertencente ao grupo controle (média aritmética), nas condições climáticas verificadas durante o experimento, foi de 38,59°C. Considerando que a temperatura normal de ovinos oscila entre 37,5°C e 39,5°C, adotou-se essa faixa como sinal de normotermia. Analisando-se a temperatura retal de cada um dos grupos experimentais, observou-se ocorrência de hipertermia no ovino inoculado com taquizoítos no 3°, 5°, 7° e 11° DPI. No animal inoculado com oocistos de *T. gondii*, o aumento da temperatura corporal foi assinalado, de forma similar, no 3°, 5° e 11° DPI. A Tabela 11 e Figura 4 permitem uma melhor visualização destes resultados.

Tabela 11. Temperatura retal em °C mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Número do Ovino	Inóculo	Temperatura °C/Dias pós inoculação													
		-1	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
1224	Oocistos	38,8	41	40	39,1	40,3	38,3	38,7	37,7	38,9	38,7	39,2	38,8	38,6	38,9
1234	Taquizoítos	38,5	39,9	40,1	39,9	41	38,8	38,1	38,3	38,6	38	37,5	38,3	38	38,7
546	Controle	38,5	38,4	38,6	38,9	38,7	38,8	39,3	38	38,2	38,4	38,8	38,4	38,8	38,5

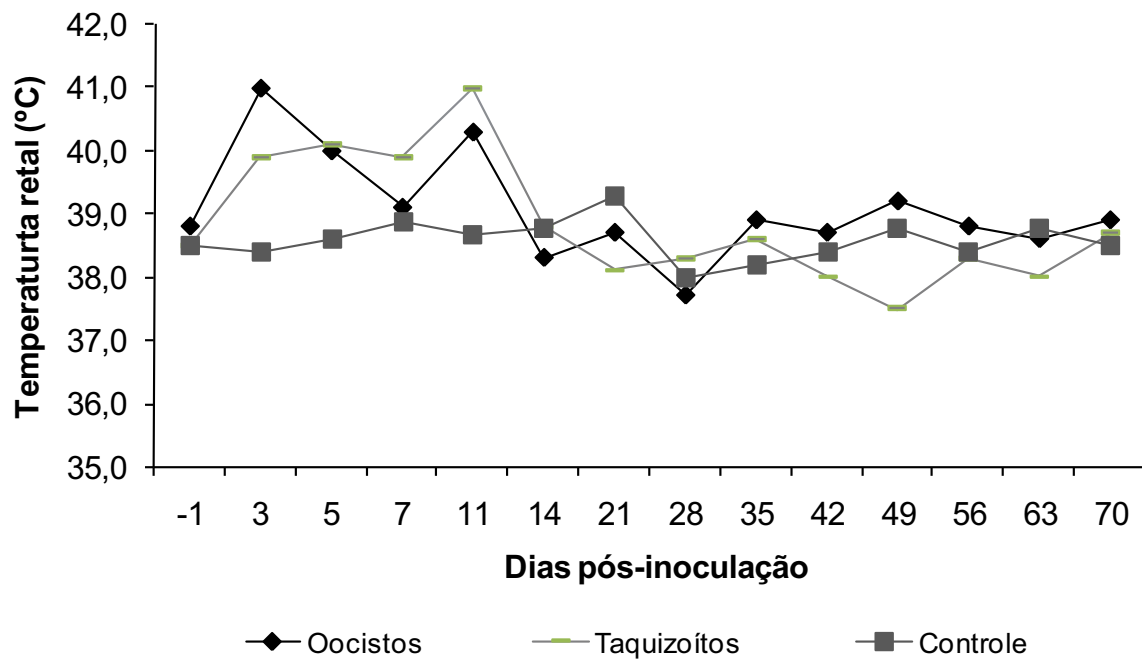


Figura 4. Temperatura retal mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

5.6.2.2 - Frequência cardíaca

Com base na variação das frequências cardíacas obtidas do ovino do grupo controle, estabeleceu-se, como parâmetro de normalidade, o valor de 84 a 137 batimentos por minuto. Sendo assim, não foi detectada bradicardia ou taquicardia nos três reprodutores experimentais. Tais resultados também estão registrados na Tabela 12 e Figura 5.

Tabela 12. Frequências cardíacas em minutos mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Número do Ovino	Inóculo	Frequência cardíaca (bpm)/Dias pós-inoculação													
		-1	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
1224	Oocistos	110	115	105	100	125	104	124	90	100	100	120	100	96	120
1234	Taquizoítos	115	110	120	116	128	128	120	112	120	124	128	120	120	100
546	Controle	117	124	110	105	120	120	112	120	115	120	124	116	120	120

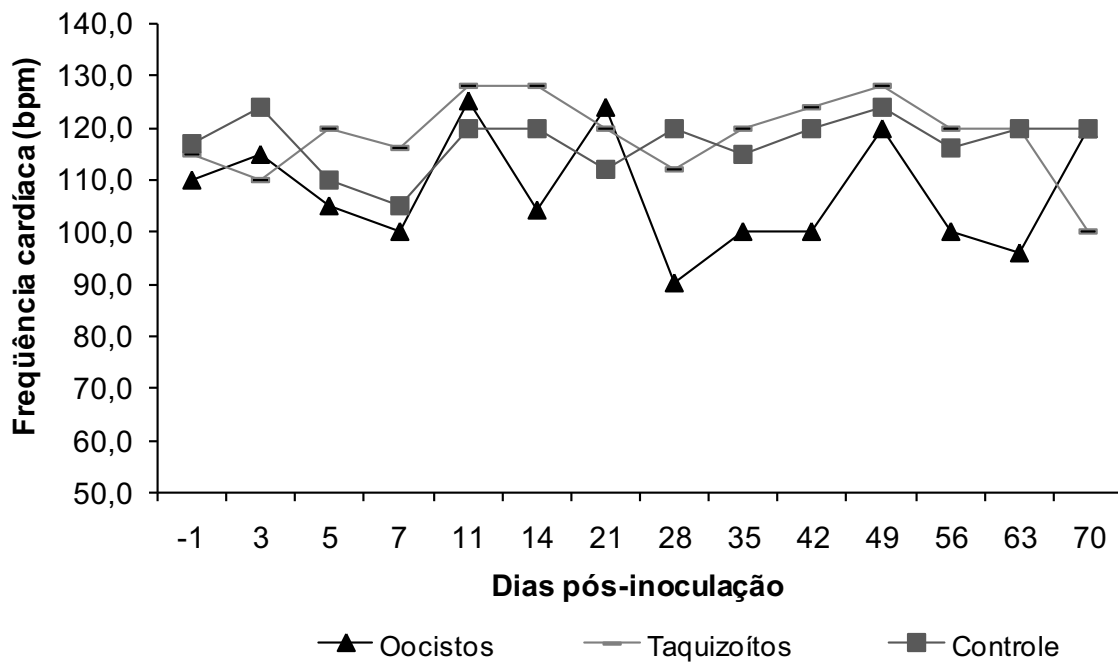


Figura 5. Freqüência cardíaca mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

5.6.2.3 - Frequência respiratória

A frequência respiratória média detectada nos ovinos do grupo controle foi de 20 a 36 movimentos respiratórios por minuto, sendo esta amplitude indicativa de normopnéia. Com base nestes dados, taquipnéia foi observada nos animais inoculados com taquizoítos no 3º e 21º dia pós-infecção. Nos ovinos que receberam oocistos, aumento dos movimentos respiratórios ocorreu no 5º, 11º, 21º e 63 dia pós-inoculação. Tais resultados estão expressos na Tabela 13 e Figura 6.

Os resultados da análise estatística referentes aos três parâmetros clínicos avaliados, encontram-se na Tabela 14.

Tabela 13. Frequências respiratórias em minutos mensuradas nos ovinos não inoculados (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Número do Ovino	Inóculo	Frequências respiratórias (mpm)/Dias pós inoculação													
		-1	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
1224	Oocistos	24	36	40	24	40	36	48	28	32	36	32	36	40	32
1234	Taquizoítos	28	42	38	28	24	32	56	32	32	32	32	32	32	24
546	Controle	24	26	24	24	28	26	28	24	20	24	32	26	36	24

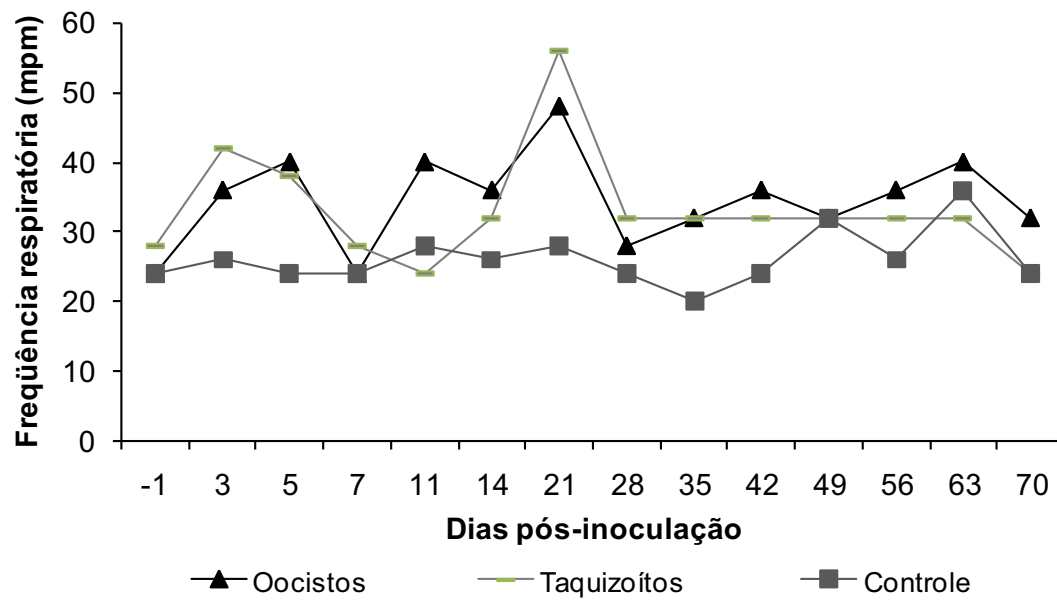


Figura 6. Frequências respiratórias mensuradas nos ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Tabela 14. Médias e desvio padrões dos parâmetros clínicos observados nos períodos pré (dia -1) e pós-inoculação (dia 3 a 70) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Tratamentos	Parâmetros Clínicos / Médias ¹ e Desvio Padrões		
	Frequência Respiratória	Frequência Cardíaca	Temperatura Retal
Oocistos	34,57 ± 6,58 ^A	107,79 ± 11,21 B	39,07 ± 0,85 A
Taquizoítos	33,14 ± 8,10 A	118,64 ± 7,78 A	38,84 ± 1,00 A
Controle	26,14 ± 3,96 B	117,36 ± 5,36 A	38,59 ± 0,32 A
Valor de F ²	6,85	6,87	1,32
Pr > F ³	0,0028	0,0028	0,2789
DMS ⁴	5,94	7,80	0,72

1: Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05)

2: Valor do Teste F

3: Probabilidade de significância do Teste F

4: Diferença mínima significativa do Teste Tukey

5.6.2.4 - Outros sinais clínicos

Outros sinais clínicos, além dos parâmetros vitais (temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória), também puderam ser observados nos ovinos durante o experimento. Os dois ovinos inoculados com oocistos ou taquizoítos apresentaram inapetência, apatia e fezes pastosas até o 11º DPI.

5.7- Resposta Imune Humoral dos machos

As recíprocas dos títulos obtidos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI (CAMARGO, 1964), estão expressas na Tabela 15. Verificou-se a soroconversão (título ≥ 64), a partir do 5º DPI, tanto no ovino inoculado com oocistos quanto no infectado com taquizoítos. Título sorológico máximo (4096) foi detectado do 21º ao 56º DPI e do 21º aos 63 DPI nos ovinos infectados oocistos e taquizoítos de *T. gondii*, respectivamente. Embora tenham ocorrido alterações nos títulos de anticorpos no decorrer do experimento, decréscimos acentuados destes títulos foram observados apenas a partir do 63º e 70º DPI no ovino do grupo 1 (oocistos) e 2 (taquizoítos), respectivamente.

Os animais do grupo controle não apresentaram anticorpos contra *T. gondii* ao longo de todo experimento.

Tabela 15. Recíproca dos títulos sorológicos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) nos ovinos machos não inoculado (controle) e infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Dia pós-inoculação	Recíproca dos títulos sorológicos		
	Nº do ovino/ oocistos	Nº do ovino/ taquizoítos	Nº do ovino/ controle
	1224	1234	546
-30	-	-	-
-15	-	-	-
-7	-	-	-
-1	-	-	-
3	-	-	-
5	64	64	-
7	64	64	-
11	64	64	-
14	256	1024	-
21	4096	4096	-
28	4096	4096	-
35	4096	4096	-
42	1024	4096	-
49	4096	4096	-
56	4096	4096	-
63	1024	4096	-
70	256	528	-

- = Sorologia negativa

5.8 - Exames do sistema reprodutor dos ovinos infectados experimentalmente

5.8.1 - Parâmetros espermáticos

O volume de ejaculado considerado normal para ovinos a partir de 10 meses de idade é de, no mínimo, 1,0 mL (MAIA, 1998). A motilidade espermática, pelos mesmos critérios, não deve ficar aquém dos 70% dos espermatozoides de um reprodutor normal e o vigor, determinado por MIES FILHO et al., (1992), teve seu limite fixado entre 0 e 5.

Para os animais inoculados com oocistos, diminuição da motilidade espermática (<70%) foi observada nos 5^o, 7^o, 11^o, 42^o, 49^o e 70^o DPI. De forma semelhante, o mesmo ocorreu com o sêmen do ovino inoculado com taquizoítos nos dias 7, 11, 42, 63 e 70 pós-inoculação. Salienta-se, entretanto, que o mesmo ocorreu no 35^o, 42^o, 56^o e 70^o DPI no sêmen do ovino pertencente ao grupo controle.

Convém salientar que não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os três grupos, em relação aos cinco parâmetros reprodutivos avaliados nos reprodutores. Os resultados acima descritos podem ser visualizados nas Tabelas 16, 17 e Figuras 7 a 12.

Tabela 16. Parâmetros seminais de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

DPI*	Número do ovino	Inóculo	Parâmetros Seminais					
			Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração ($\times 10^6$ spzt/mL)	Patologias (%)	
							Cabeça	Cauda
-1	1224	Oocistos	1,4	90	4	16,5	2	2
	1234	Taquizoítos	1,3	80	4	15,3	1	1
	546	Controle	1,2	90	4	15,5	1	4
3	1224	Oocistos	1,3	90	4	20,7	2	3
	1234	Taquizoítos	1,5	70	4	29,8	1	2
	546	Controle	1,5	90	4	45,0	2	1
5	1224	Oocistos	2	60	3	80,5	1	1
	1234	Taquizoítos	1,7	70	2	50,5	2	4
	546	Controle	1,5	90	4	65,0	0	2
7	1224	Oocistos	1,7	60	3	50,0	0	1
	1234	Taquizoítos	1,4	50	4	35,0	0	1
	546	Controle	1,9	70	4	65,0	0	1
11	1224	Oocistos	1,8	50	3	70,0	2	3
	1234	Taquizoítos	1,4	20	4	56,0	1	1
	546	Controle	1,7	70	4	76,0	1	2
14	1224	Oocistos	1,5	90	4	98,0	1	2
	1234	Taquizoítos	1,3	90	5	37,0	0	0
	546	Controle	1,2	70	4	32,0	1	2
21	1224	Oocistos	1,3	90	3	120,0	1	1
	1234	Taquizoítos	2	80	4	60,0	1	1
	546	Controle	1,2	90	3	76,0	0	1
28	1224	Oocistos	1,4	70	4	57,0	1	1
	1234	Taquizoítos	1,7	80	5	50,0	0	1
	546	Controle	1,8	90	3	57,0	0	2
35	1224	Oocistos	1,5	80	4	100,0	0	1
	1234	Taquizoítos	1,3	90	4	56,0	1	1
	546	Controle	1,7	50	2	34,0	1	1
42	1224	Oocistos	1,8	60	3	59,0	1	2
	1234	Taquizoítos	1,2	60	4	67,0	2	1
	546	Controle	1,8	60	4	79,0	1	2
49	1224	Oocistos	1,5	60	4	58,0	0	2
	1234	Taquizoítos	1,5	70	3	66,0	1	1
	546	Controle	1,4	70	2	36,0	0	4
56	1224	Oocistos	2,5	80	5	39,0	1	1
	1234	Taquizoítos	1,3	90	3	43,0	2	2
	546	Controle	2	60	3	80,0	1	3
63	1224	Oocistos	1,5	90	5	97,0	2	4
	1234	Taquizoítos	1	50	1	28,0	1	0
	546	Controle	1,8	80	4	19,6	1	1
70	1224	Oocistos	1,6	60	3	45,5	1	5
	1234	Taquizoítos	1,2	30	5	69,0	1	4
	546	Controle	1,4	40	2	50,0	3	3

* Dias pós-inoculação

Tabela 17. Resultados das análises paramétricas e não paramétrica dos parâmetros seminais nos períodos pré (dia -1) e pós-inoculação (dia 3 a 70) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Inóculo	Parâmetros Seminais / Médias ¹ e Desvio Padrões					
	Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração (x10 ⁶ sptz/mL)	Cabeça	Cauda
Oocistos	1,63 ± 0,32	74,86 ± 15,57	3,71 ± 0,73	65,09 ± 30,85	1,07 ± 0,73	2,07 ± 1,27
Taquizoítos	1,41 ± 0,25	68,43 ± 23,25	3,71 ± 1,14	47,33 ± 16,46	1,00 ± 0,68	1,43 ± 1,22
Controle	1,58 ± 0,27	73,71 ± 16,55	3,36 ± 0,84	52,15 ± 22,26	0,86 ± 0,86	2,07 ± 1,07

1: Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05)

*: Tabela de contingência: totais seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de qui-quadrado (P>0,05)

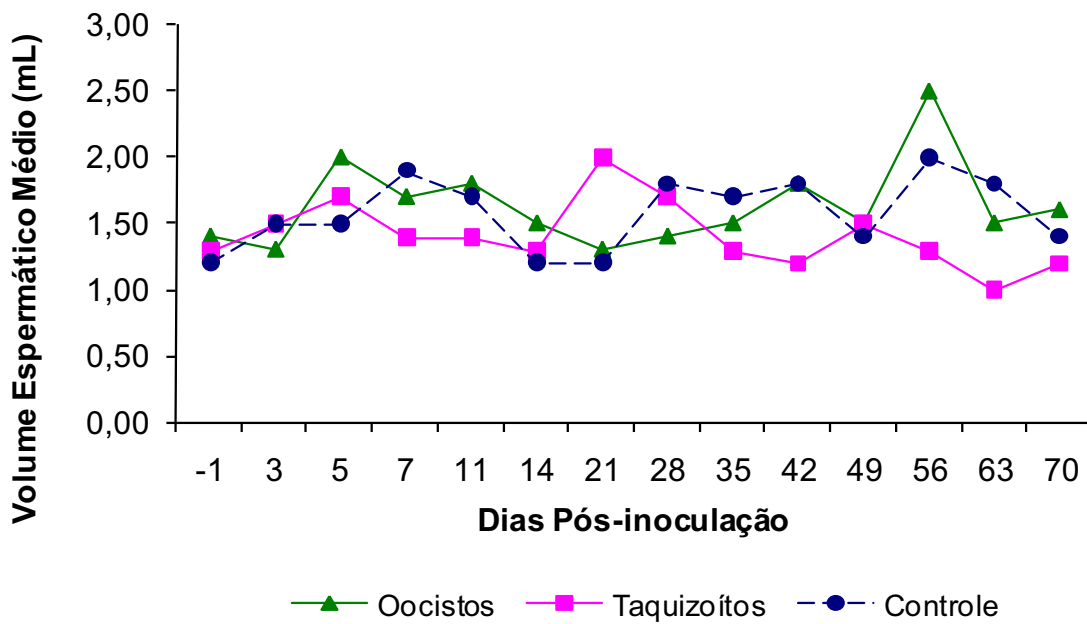


Figura 7. Volume espermático (mL) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

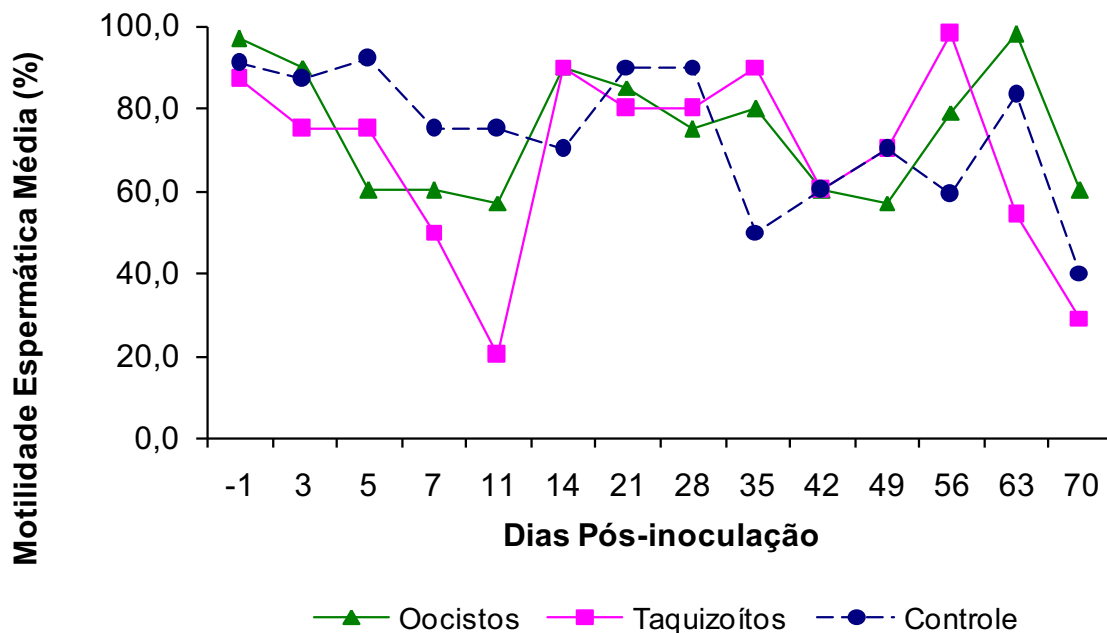


Figura 8. Motilidade espermática (%) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

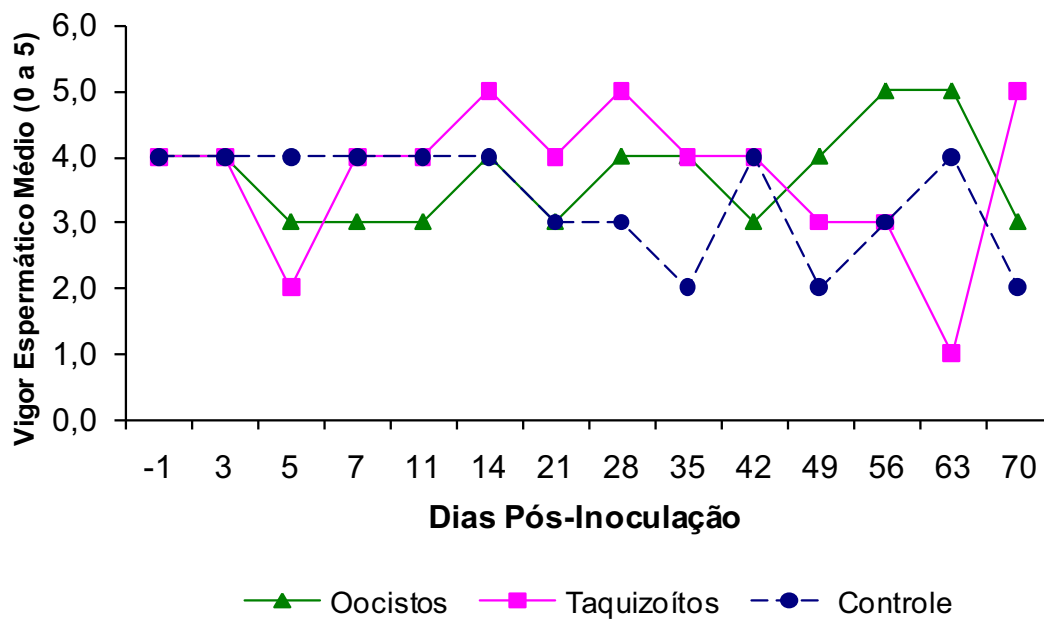


Figura 9. Vigor espermático (0 - 5) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

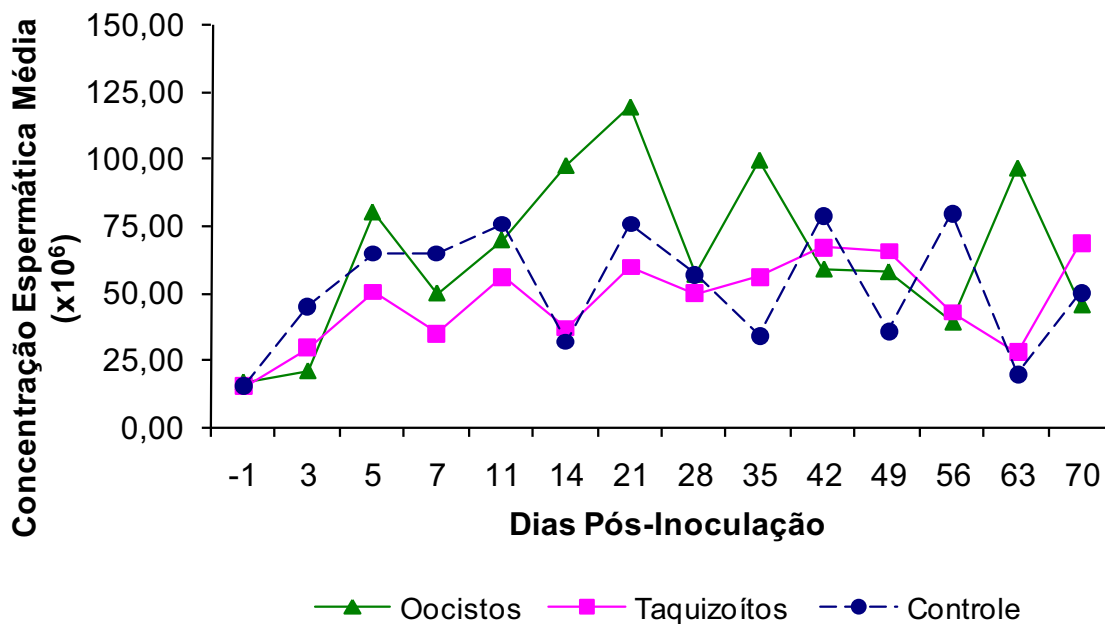


Figura 10. Concentração espermática média ($\times 10^6$) de ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos *Toxoplasma gondii*.

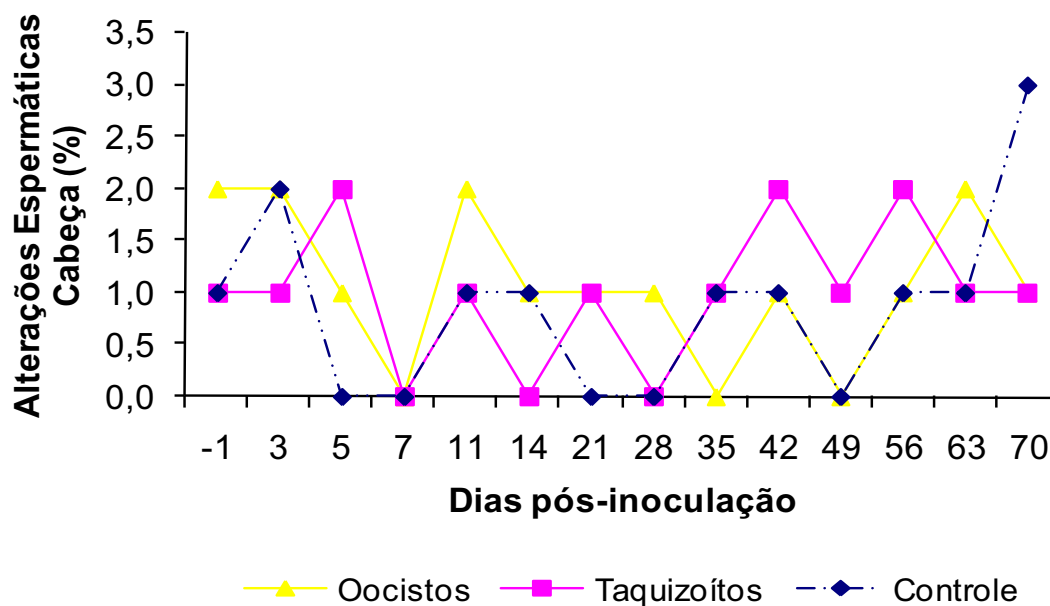


Figura 11. Alterações espermáticas de cabeça (%) em ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

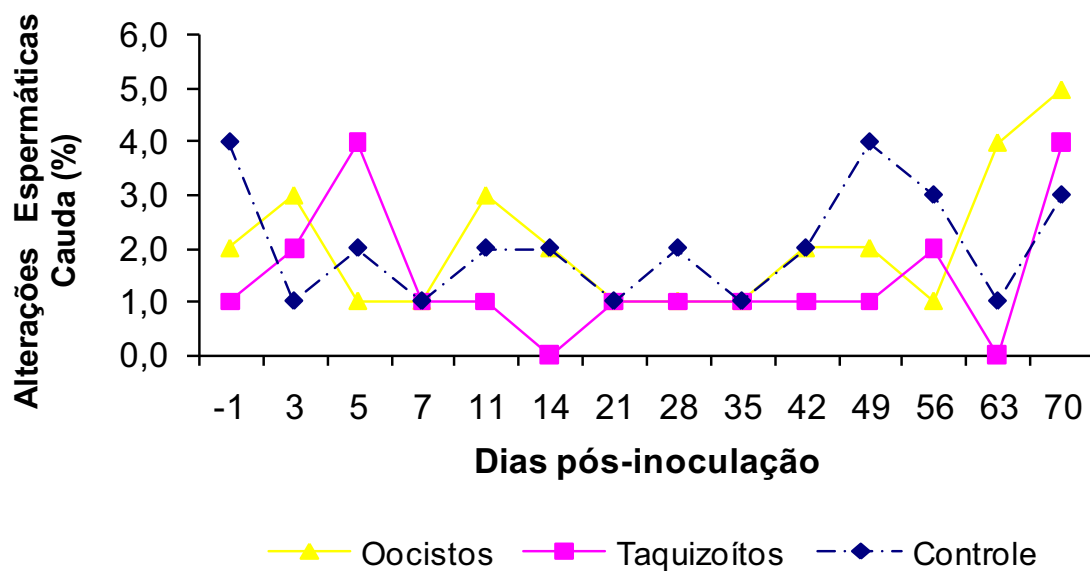


Figura 12. Alterações espermáticas de cauda (%) em ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

5.9 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos ovinos pelo bioensaio

Foi possível detectar a presença deste coccídio por meio da comprovação sorológica e presença de cistos cerebrais, contendo bradizoítos de *T. gondii*, em camundongos que receberam amostras seminais do ovino infectado com oocistos no 35°, 42°, 63° e 70° dias pós-inoculação e em camundongos inoculados com sêmen do ovino inoculado com taquizoítos no 11°, 49°, 56° e 70° DPI (Tabela 18).

Tabela 18. Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em camundongos inoculados com amostras seminais oriundas dos reprodutores ovinos não inoculado (controle) e infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Número do ovino	Inóculo	Bioensaio/dias pós-inoculação														
		-1	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	Total
1224	Oocistos	-	-	-	-	-	-	-	-	Positivo*	Positivo*	-	-	Positivo*	Positivo*	4
Total		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	4
1234	Taquizoítos	-	-	-	-	Positivo*	-	-	-	-	-	Positivo*	Positivo*	-	Positivo*	4
Total		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	4
546	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Positivo* = RIFI para *T. gondii* (≥ 64) e presença de cistos cerebrais em camundongos inoculados

- = Sorologia negativa (camundongos)

5.10 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos ovinos pela PCR

Das oito amostras seminais positivas na sorologia (RIFI) e bioprova em camundongos (presença de cistos cerebrais), foi possível detectar a presença do DNA de *T. gondii* pela técnica da PCR no 42º dias pós-inoculação para o ovino inoculado com oocistos e no 70º DPI para o ovino infectado com taquizoítos de *T. gonii*. A Figura 13 ilustra o produto de PCR amplificado de 194 bp (pares de base) para as datas supracitadas, indicando a presença/ausência do parasito.

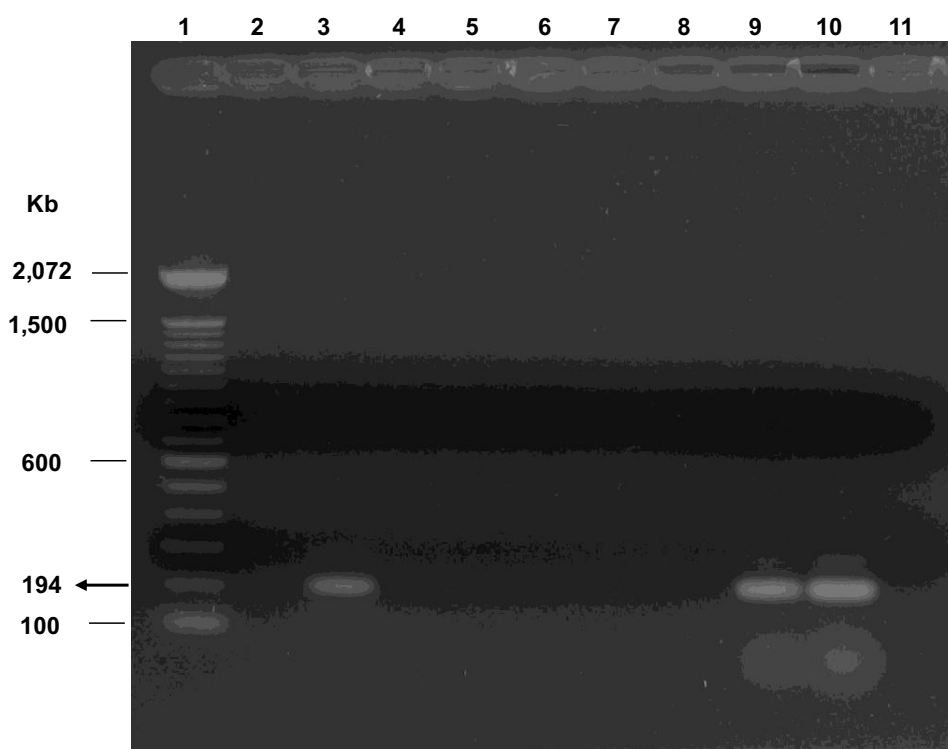


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras seminais dos ovinos experimentalmente infectados. (1) Marcador de peso molecular DNA Ladder (100bp). (2) Sêmen do ovino 1224-G1 (35 dias pós-inoculação). (3) Sêmen do ovino 1224-G1 (42 dias pós-inoculação). (4) Sêmen do ovino 1224-G1 (63 dias pós-inoculação). (5) Sêmen do ovino 1224-G1 (70 dias pós-inoculação). (6) Sêmen do ovino 1234-G2 (14 dias pós-inoculação). (7) Sêmen do ovino 1234-G2 (49 dias pós-inoculação). (8) Sêmen do ovino 1234-G2 (56 dias pós-inoculação). (9) Sêmen do ovino 1234-G2 (70 dias pós-inoculação). (10) Controle positivo. (11) Controle negativo.

5.11 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* em testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata dos ovinos reprodutores

5.11.1 - Exames anatomo - histopatológicos dos ovinos machos

Os exames histopatológicos realizados nos ovinos não inoculado (controle) e infectados, necropsiados ao 78º DPI, foram negativos para presença de *T. gondii*. Observou-se, entretanto, infiltrado inflamatório focal mononuclear intersticial na próstata e na vesícula seminal de ovinos inoculados com oocistos e taquizoítos, respectivamente. Salienta-se, que tais lesões não foram observadas no reprodutor pertencente ao grupo controle (Figura 14).

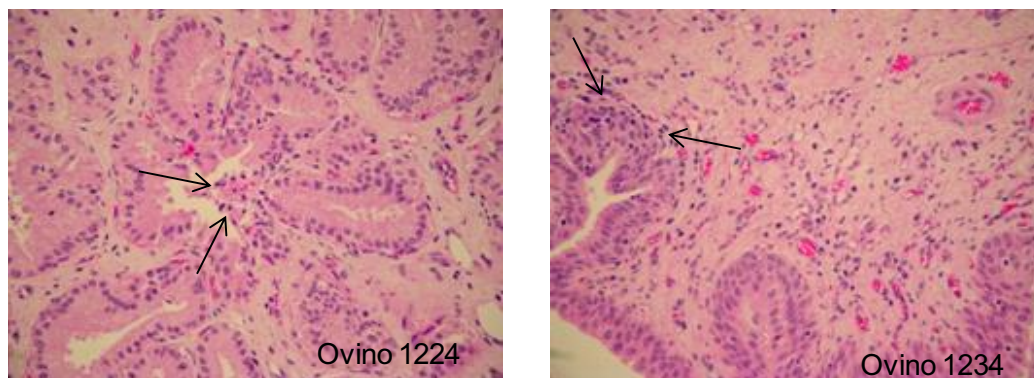


Figura 14. Fotomicrografia do sistema reprodutor mostrando infiltrado inflamatório focal mononuclear intersticial em próstata (40X) do ovino infectado com oocistos e em vesícula seminal (20X) do ovino inoculado com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

5.11.2 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* nos diferentes tecidos dos ovinos machos reprodutores pelo bioensaio

Foi possível detectar o parasitismo tissular por este coccídio (RIFI positiva - 64) e a presença de cistos cerebrais (bradizoítos) em camundongos inoculados com tecidos dos dois ovinos infectados com oocistos ou taquizoítos de *T. gondii*.

5.11.3 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* nos diferentes tecidos dos ovinos machos reprodutores pela PCR

A Figura 15, ilustra a presença/ausência do DNA de *T. gondii* do “pool” de tecidos (testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata) de cada animal. Verifica-se que foi possível, por meio desta técnica, diagnosticar a presença do DNA do presente parasito apenas no ovino infectado com taquizoítos de *T. gondii*.

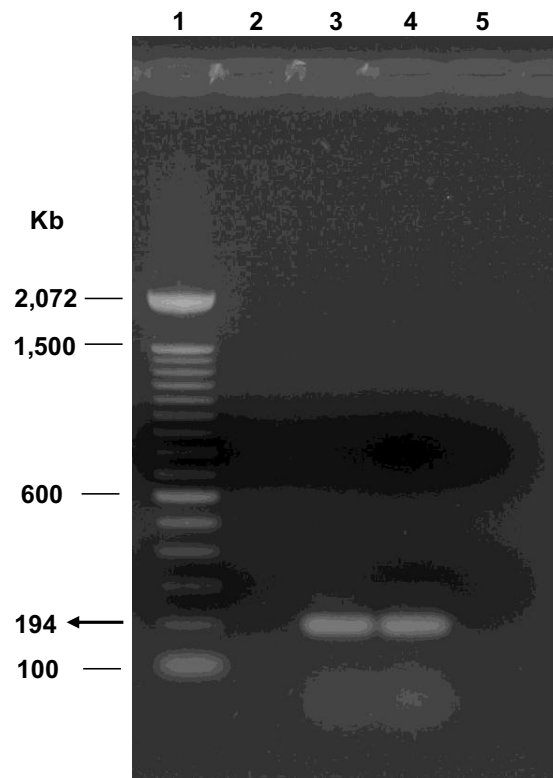


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do “pool” das amostras de tecidos (testículos, vesícula seminal, próstata e epidídimos) dos ovinos experimentalmente infectados. (1) Marcador de peso molecular DNA Ladder (100bp). (2) Ovino 1224 (inoculado com oocistos). (3) Ovino 1234 (inoculado com taquizoítos). (4) Controle positivo. (5) Controle negativo.

PARTE II: FÊMEAS – (RESULTADOS)

5.12 - Seleção das ovelhas reprodutoras para realização da Montagem natural

Pelos resultados dos exames sorológicos realizados em 67 ovelhas, relativos à presença de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella abortus* e *Leptospira sorovares pomona*, *icterihaemorrhagea* e *canicula*, foi possível selecionar 12 ovelhas negativas para as quatro enfermidades citadas anteriormente. Estes resultados sorológicos encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Anticorpos contra infecção por *Toxoplasma*, *Neospora*, *Brucela* e *Leptospira* das ovelhas examinadas para seleção e formação dos grupos experimentais.

Número da ovelha	Agente etiológico			
	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Neospora caninum</i>	<i>Brucela abortus</i>	<i>Leptospira</i> spp.
36	+	-	-	+
10	-	-	-	-
35	+	+	-	+
452	-	-	+	+
493	+	-	-	+
572	+	-	+	+
15	+	+	-	-
53	+	-	+	-
56	-	-	-	-
238	-	-	-	-
9	-	-	+	+
25	+	-	+	+
263	+	+	-	+
21	+	-	-	-
194	+	-	+	-
58	-	-	-	-
7	+	-	+	+
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
30	+	-	-	-
341	+	+	-	+
38	+	-	+	+
48	+	-	-	-
59	+	-	+	-
321	+	+	-	+
478	-	-	-	+
521	+	-	+	-
12	+	-	-	+
37	-	-	+	-
184	-	-	-	-
16	-	-	-	-
46	+	-	-	+
18	+	-	-	-
27	+	-	+	+
65	+	-	+	-
63	+	-	-	+
3	-	+	+	-
61	+	-	-	+
22	-	-	-	-
2	-	+	-	-
62	+	-	+	+
17	+	-	-	+
112	-	+	-	+
23	+	-	+	-
55	+	+	+	+
313	-	-	+	-
239	-	-	-	-
13	+	-	-	+
43	+	-	+	-
44	+	+	+	+
33	+	-	-	+
402	+	+	+	+
8	+	-	+	+
28	+	-	-	-
50	+	+	+	+
6	-	-	-	-
20	+	-	-	-
390	+	-	+	+
64	+	+	+	+
14	+	-	+	-
423	+	-	-	+
24	+	+	+	-
29	+	+	+	-
161	-	-	-	-
215	+	-	-	-
346	+	-	+	-
66	-	-	-	-

5.13 - Exames clínicos nas ovelhas reprodutoras

5.13.1 - Parâmetros clínicos pré-monta natural

Durante a fase de adaptação (antes da monta natural) não foram observadas quaisquer alterações clínicas nas ovelhas, com relação aos parâmetros temperatura retal, frequências cardíaca e respiratória (Tabela 20, 21 e 22 e Figuras 16, 17 e 18).

Tabela 20. Temperatura retal (°C) mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).

Número da Ovelha	Temperatura °C/Período de adaptação - Dias pré-experimentais (antes da monta natural)												
	-81	-74	-67	-60	-53	-46	-39	-32	-25	-18	-11	-4	
4	39,0	39,0	39,0	39,1	38,8	38,7	38,9	38,5	38,2	38,8	38,7	38,2	
5	38,4	39,1	38,7	39,0	38,2	38,8	39,1	38,7	39,0	38,2	38,8	38,7	
6	38,7	38,3	39,5	38,4	38,5	39,0	38,9	38,9	38,5	37,7	38,5	38,6	
10	38,9	39,0	38,1	38,7	38,2	38,7	38,7	38,8	39,5	38,9	38,3	38,6	
16	38,4	38,6	39,5	38,4	38,5	38,7	39,0	38,2	38,5	38,7	38,6	38,6	
22	38,7	39,0	38,1	38,7	38,2	38,5	39,3	38,4	38,6	39,0	38,8	39,0	
58	38,1	38,3	38,5	38,9	38,7	38,5	39,3	38,4	38,6	39,0	38,5	38,2	
66	39,0	38,7	39,0	38,9	38,9	38,5	37,7	38,1	38,3	39,1	38,8	38,6	
161	38,9	38,7	38,8	38,9	39,2	38,5	38,1	38,3	38,9	38,5	38,9	38,8	
184	38,5	38,9	38,5	39,0	39,1	38,8	38,7	38,9	38,5	39,0	39,0	39,0	
238	38,8	38,7	38,3	39,5	38,4	38,5	39,0	38,1	38,7	38,2	38,6	38,5	
239	38,4	38,8	38,6	38,0	38,1	37,9	39,1	38,1	38,5	38,2	39,2	38,8	
Média	38,65	38,76	38,72	38,79	38,57	38,59	38,82	38,45	38,65	38,61	38,73	38,63	

Tabela 21. Frequência cardíaca mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).

Número da Ovelha	Frequência cardíaca (bpm)/Período de adaptação - Dias pré-experimentais (antes da monta natural)											
	-81	-74	-67	-60	-53	-46	-39	-32	-25	-18	-11	-4
4	108	112	98	84	104	120	112	100	98	84	104	98
5	104	104	112	116	112	116	104	160	104	124	104	98
6	120	100	112	105	140	120	116	104	116	120	100	94
10	112	112	112	116	120	100	116	144	148	120	116	96
16	112	98	168	124	116	88	88	94	98	124	132	112
22	92	72	100	104	88	100	98	100	112	88	100	128
58	112	112	132	120	100	100	116	100	112	98	100	104
66	112	108	104	124	104	104	96	112	72	100	98	94
161	100	96	112	98	100	96	88	91	84	92	72	88
184	100	88	98	18	121	112	142	116	112	120	128	112
238	124	160	128	124	112	124	98	98	144	116	124	116
239	120	120	100	98	112	116	120	98	100	116	100	112
Média	109,67	106,83	114,67	102,58	110,75	108,00	107,83	109,75	108,33	108,50	106,50	104,33

Tabela 22. Frequência respiratória mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).

Número da Ovelha	Frequencia respiratória (mpm)/Período de adaptação - Dias pré-experimentais (antes da monta natural)												
	-81	-74	-67	-60	-53	-46	-39	-32	-25	-18	-11	-4	
4	40	44	44	48	40	48	48	40	44	48	28	32	
5	24	32	28	24	20	20	24	24	32	28	24	20	
6	28	28	28	24	32	28	28	24	24	32	28	24	
10	32	26	40	24	26	28	28	28	20	28	28	24	
16	36	36	32	34	26	36	32	32	32	36	32	30	
22	24	24	36	28	20	32	28	28	28	28	26	32	
58	24	36	28	26	28	32	40	32	28	28	32	24	
66	28	32	28	40	32	28	28	24	28	32	28	28	
161	28	32	36	28	32	44	32	36	28	32	32	32	
184	32	36	32	36	24	40	40	36	32	36	44	50	
238	24	24	28	32	24	24	28	32	44	24	28	32	
239	28	28	32	24	24	28	28	32	32	28	28	32	
Média	29,00	31,50	32,67	30,67	27,33	32,33	32,00	30,67	31,00	31,67	29,83	30,00	

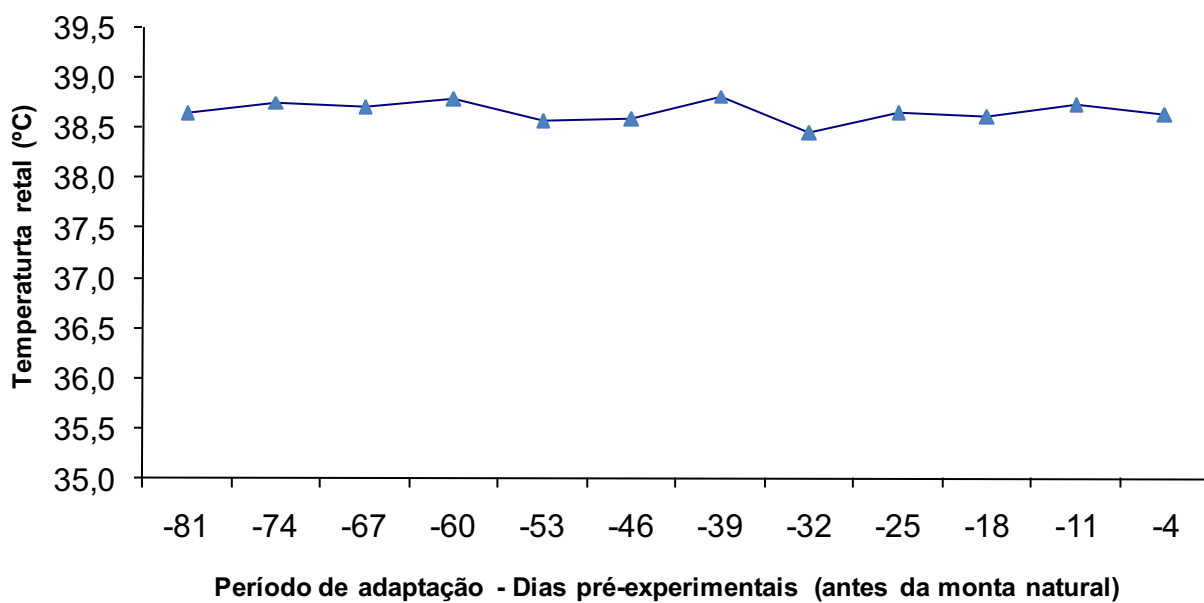


Figura 16. Médias das temperaturas retais mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).

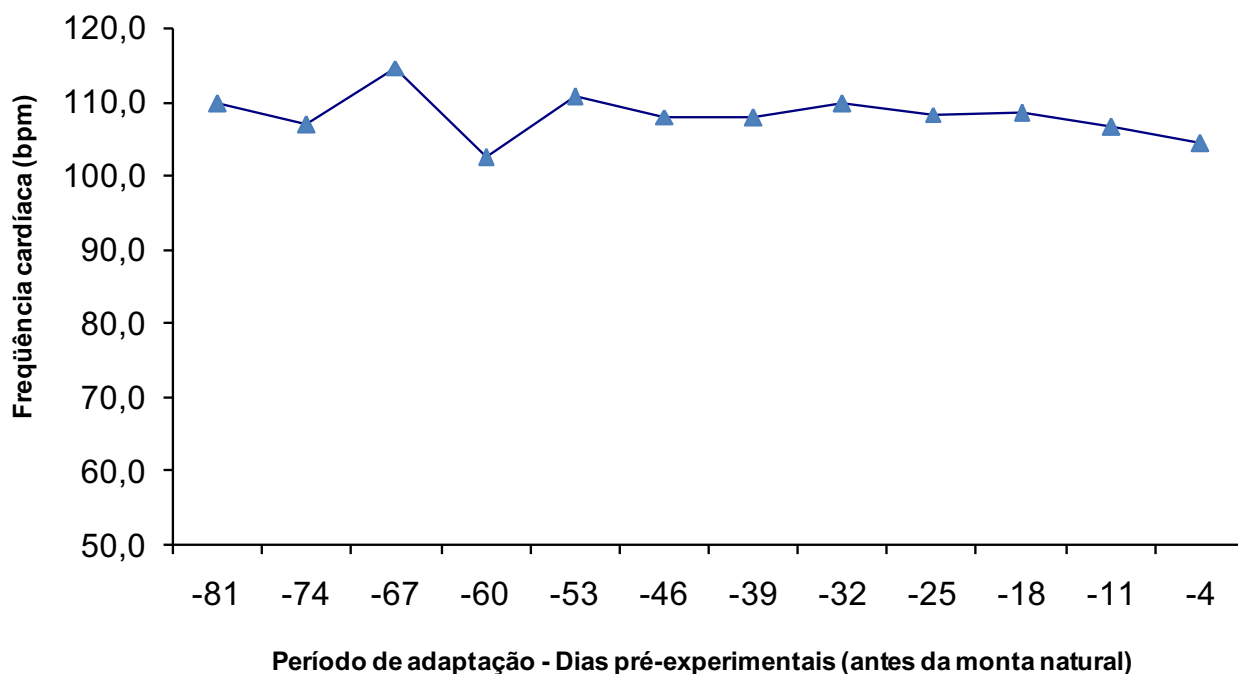


Figura 17. Médias das frequências cardíacas mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).

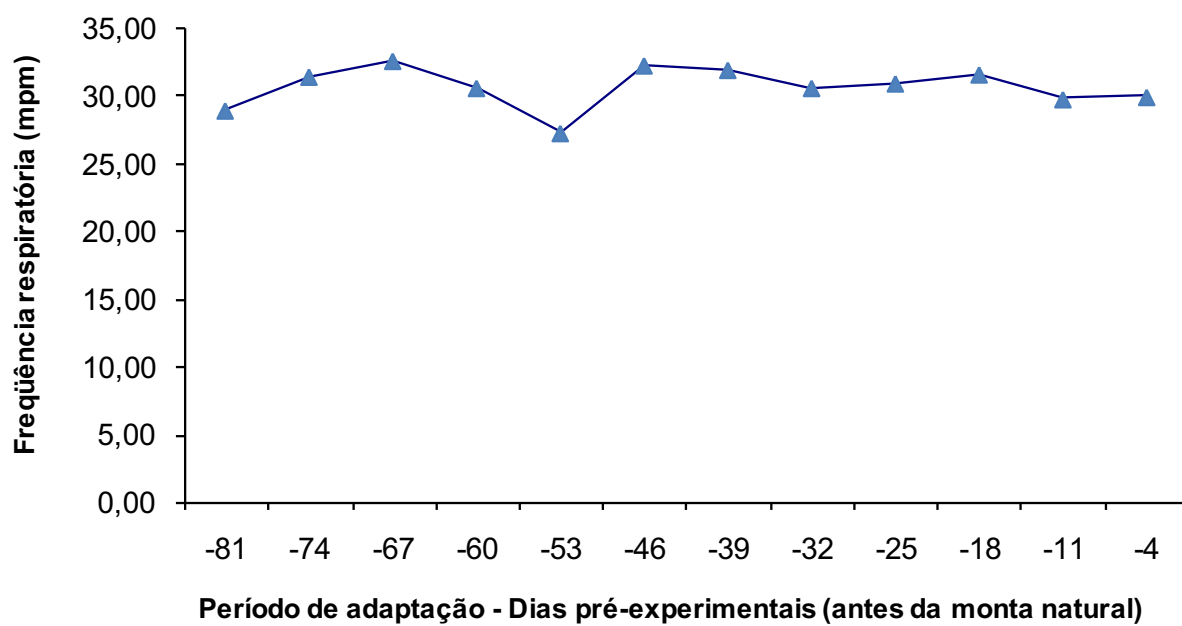


Figura 18. Médias das frequências respiratórias mensuradas nas ovelhas durante o período pré-experimental (antes da monta natural).

5.13.2 – Parâmetros clínicos pós-monta natural

5.13.2.1. Temperatura corporal (retal)

A temperatura corporal (retal) média das ovelhas pertencentes ao grupo controle (média aritmética), nas condições climáticas verificadas durante o experimento, foi de 38,74°C. Considerando que a temperatura normal de ovinos oscila entre 37,5°C e 39,5°C, adotou-se essa faixa como sinal de normotermia. Analisando-se a temperatura retal média de cada um dos grupos experimentais, observamos a ocorrência de normometria nas ovelhas dos três grupos experimentais durante todo o experimento. Vale ressaltar que, os elevados valores de temperatura registrados para algumas ovelhas (positivas ou não para *T. gondii* pela RIFI) dos três grupos experimentais, coincidiram com o terço final da gestação de cada animal (Tabelas 23, 24 e Figura 19).

Tabela 23. Temperaturas retais mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoitos *Toxoplasma gondii* (continua).

Número da Ovelha	Grupo da ovelha	Temperatura °C/Dias pós cobertura (continua)														
		-1	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
66 (1° G1)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Oocistos	38,5	39	38,7	39	38,9	38,9	38,5	37,7	38,1	38,3	39,1	38,8	38,6	38,7	
5 (2° G1)		38,8	38,7	40,1	38,8	38,6	38	38,1	37,9	39,1	38,1	38,5	38,2	39,2	39	
239 (3° G1)		38	38,5	38,3	38,1	38,2	38,7	37,8	39	38,8	39	38,8	39	38,7	38,4	38,3
4 (4° G1)		38,7	39	39	39	38,8	38,2	39,1	38,7	39	38,2	38,2	38,8	38,7	38,2	38,6
184 (5° G1)		38,3	38,5	38,9	38,5	39	39,1	38,8	38,7	38,9	38,5	39	39	39	39	39
	Média	38,46	38,74	39,00	38,68	38,70	38,58	38,46	38,40	38,82	38,38	38,88	38,68	38,68	38,72	
10 (1° G2)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Taquizoitos	38,9	39,3	38,7	38,8	38,7	38,7	38,1	38,8	39,5	38,9	38,3	38,6	38,5	38,9	
6 (2° G2)		38,8	38,7	38,3	39,5	38,4	38,5	39,4	40	38,8	38,5	38,6	38,5	38,6	38,5	
22 (3° G2)		38,7	38,7	39	38,1	38,7	38,2	38,5	39,3	38,4	38,6	39	38,8	39	38,7	
238 (4° G2)		38,5	39	39	38,6	38,6	38,9	38,7	39,5	39,5	39,6	40	40,2	40,1	NR	
161 (5° G2)		38,8	38,7	38,8	38,9	39,2	38,5	38,1	38,3	38,9	38,5	38,9	38,8	38,7	38,5	
	Média	38,74	38,88	38,76	38,78	38,72	38,56	38,56	39,18	39,02	38,82	38,96	38,98	38,98	38,65	
16	Controle	38,6	39,1	38,6	39,5	38,4	38,5	38,7	39	38,2	38,5	38,7	38,6	38,6	38,7	
58		38,1	38,3	38,5	38,9	38,7	38,5	39,3	38,4	38,6	39	38,5	38,2	39,2	38,8	
	Média	38,35	38,70	38,55	39,20	38,55	38,50	39,00	38,70	38,40	38,75	38,60	38,40	38,90	38,75	

NR - Animal eutanasiado

Tabela 23. Temperaturas retais mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos *Toxoplasma gondii* (continuação).

Número da Ovelha	Grupo da ovelha	Temperatura °C/Dias pós cobertura (continuação)														
		77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154	161	168	
66 (1° G1)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Oocistos	38,9	38,8	38,9	38,8	38,7	38,9	38,9	39	38,9	38,6	39,2	39,7	38,9	38,7	
5 (2° G1)		39	39,1	39,2	39	38,8	38,7	38,5	38,7	39,3	39	38,1	NR	NR	NR	
239 (3° G1)		38,7	38,8	39,3	39,2	38,3	38,3	38,7	38,4	39,4	38,4	38,7	38,8	39,5	38,7	
4 (4° G1)		39	38,6	38,9	39,1	38,7	38,9	39,6	39	38,9	39,2	38,7	38,9	38,8	38,9	
184 (5° G1)		39,1	39	40,1	38,7	39	38,8	39,9	40,8	39,8	40	40,2	39,7	40,1	39,9	
Média		38,94	38,86	39,28	38,96	38,70	38,72	39,12	39,18	39,26	39,04	38,98	39,28	39,33	39,05	
10 (1° G2)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Taquizoítos	38,9	38,9	38,5	38,3	38,4	38,1	39,1	39,1	39,1	38,7	38,1	39	38,9	39	
6 (2° G2)		39,2	39,5	39	38,7	38,3	39,4	39,1	39	39	38,9	38,5	39,3	39,1	40	
22 (3° G2)		38,9	38,6	39,2	38,7	38,6	38,5	38,6	38,4	38,7	38,8	38,5	38,6	38,8	38,9	
238 (4° G2)		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
161 (5° G2)		39,3	38,8	38,4	38,9	37,9	39,5	39,4	38,3	38,9	39	39,1	38,7	39	39,2	
Média		39,08	38,95	38,78	38,65	38,30	38,88	39,05	38,70	38,93	38,85	38,55	38,90	38,95	39,28	
16	Controle	38,5	39,3	38,6	39	38,9	38,9	38,5	38,4	39,4	38,4	38,7	38,8	39,5	38,7	
58		38,9	39,2	38,5	38,1	38,3	38,9	38,5	38,7	39,5	38,8	38,6	39,1	38,9	38,9	
Média		38,70	39,25	38,55	38,55	38,60	38,90	38,50	38,55	39,45	38,60	38,65	38,95	39,20	38,80	

NR - Animal eutanasiado

Tabela 24. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro temperatura retal (°C) de ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos *Toxoplasma gondii*.

Dias pré e pós-monta natural	Grupos Experimentais / Médias ¹ e Desvios Padrões						DTP*	
	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho inoculado com oocistos		Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho inoculado com taquizoítos		Controle		Valor de F	Pr > F
-1	38,5 ± 0,3	Aa	38,7 ± 0,2	Aa	38,4 ± 0,4	Aa	0,80	0,4512
3	38,7 ± 0,3	Aa	38,9 ± 0,3	Aa	38,7 ± 0,6	Aa	0,18	0,8320
5	39,0 ± 0,7	Aa	38,8 ± 0,3	Aa	38,6 ± 0,1	Aa	0,87	0,4220
7	38,7 ± 0,4	Aa	38,8 ± 0,5	Aa	39,2 ± 0,4	Aa	1,05	0,3530
11	38,7 ± 0,3	Aa	38,7 ± 0,3	Aa	38,6 ± 0,2	Aa	0,12	0,8904
14	38,6 ± 0,5	Aa	38,6 ± 0,3	Aa	38,5 ± 0,0	Aa	0,02	0,9759
21	38,5 ± 0,5	Aa	38,6 ± 0,5	Aa	39,0 ± 0,4	Aa	1,13	0,3244
28	38,4 ± 0,6	Ba	39,2 ± 0,7	Aa	38,7 ± 0,4	ABa	4,08	0,0181
35	38,8 ± 0,4	Aa	39,0 ± 0,5	Aa	38,4 ± 0,3	Aa	1,47	0,2332
42	38,4 ± 0,3	Aa	38,8 ± 0,5	Aa	38,8 ± 0,4	Aa	1,39	0,2518
49	38,9 ± 0,2	Aa	39,0 ± 0,6	Aa	38,6 ± 0,1	Aa	0,50	0,6092
56	38,7 ± 0,3	Aa	39,0 ± 0,7	Aa	38,4 ± 0,3	Aa	1,42	0,2442
63	38,7 ± 0,4	Aa	39,0 ± 0,7	Aa	38,9 ± 0,4	Aa	0,62	0,5386
70	38,7 ± 0,3	Aa	38,7 ± 0,2	Aa	38,8 ± 0,1	Aa	0,05	0,9558
77	38,9 ± 0,2	Aa	39,1 ± 0,2	Aa	38,7 ± 0,3	Aa	0,50	0,6074
84	38,9 ± 0,2	Aa	39,0 ± 0,4	Aa	39,3 ± 0,1	Aa	0,58	0,5600
91	39,3 ± 0,5	Aa	38,8 ± 0,4	Aa	38,6 ± 0,1	Aa	2,62	0,0749
98	39,0 ± 0,2	Aa	38,7 ± 0,3	Aa	38,6 ± 0,6	Aa	0,89	0,4117
105	38,7 ± 0,3	Aa	38,3 ± 0,3	Aa	38,6 ± 0,4	Aa	0,97	0,3797
112	38,7 ± 0,2	Aa	38,9 ± 0,7	Aa	38,9 ± 0,0	Aa	0,20	0,8223
119	39,1 ± 0,6	Aa	39,1 ± 0,3	Aa	38,5 ± 0,0	Aa	1,54	0,2168
126	39,2 ± 0,9	Aa	38,7 ± 0,4	Aa	38,6 ± 0,2	Aa	2,12	0,1226
133	39,3 ± 0,4	Aa	38,9 ± 0,2	Aa	39,5 ± 0,1	Aa	1,16	0,3142
140	39,0 ± 0,6	Aa	38,9 ± 0,1	Aa	38,6 ± 0,3	Aa	0,76	0,4670
147	39,0 ± 0,8	Aa	38,6 ± 0,4	Aa	38,7 ± 0,1	Aa	1,18	0,3100
154	39,3 ± 0,5	Aa	38,9 ± 0,3	Aa	39,0 ± 0,2	Aa	0,83	0,4379
161	39,3 ± 0,6	Aa	39,0 ± 0,1	Aa	39,2 ± 0,4	Aa	0,76	0,4665
168	39,1 ± 0,6	Aa	39,3 ± 0,5	Aa	38,8 ± 0,1	Aa	0,83	0,4379
DDT**	Valor de F	1,94	1,02	0,83				
	Pr > F	0,0650	0,4467	0,7111				

1: Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ($P > 0,05$)

*: Desdobramento dos tratamentos dentro de cada dia.

** : Desdobramento dos dias dentro de cada Tratamento

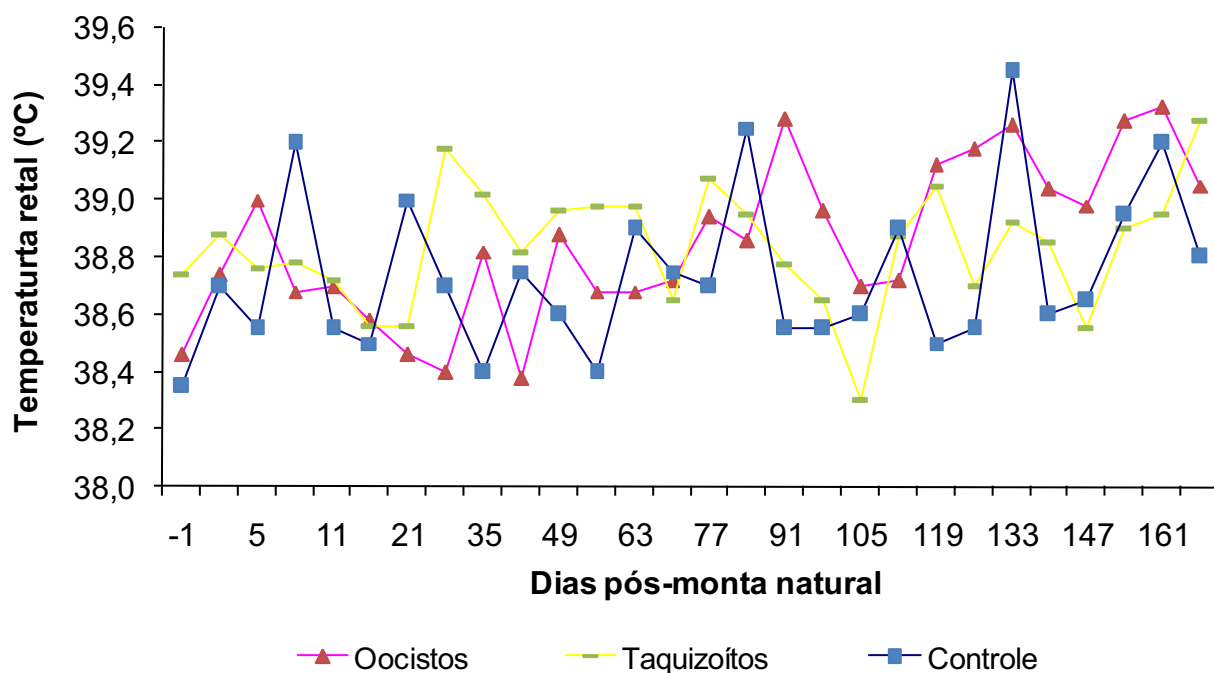


Figura 19. Temperaturas retais médias mensuradas nas ovelhas após a monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

5.13.2.2- Frequência cardíaca

Com base na variação das frequências cardíacas médias obtidas das ovelhas do grupo controle, estabeleceu-se, como parâmetro de frequência cardíaca os valores de 84 a 137 batimentos por minuto (padrão da normalidade).

Foi possível observar algumas alterações estatisticamente significativas deste parâmetro clínico em ovelhas, dos três grupos experimentais ($P \leq 0,05$). Entretanto, tais valores ocorreram tanto nas fêmeas que soroconverteram quanto nas que não apresentaram anticorpos específicos para *T. gondii*. Tais resultados estão registrados nas Tabelas 25, 26 e Figura 20.

Tabela 25. Frequências cardíacas mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (continua).

Número da Ovelha	Grupo da ovelha	Frequência cardíaca (bpm)/Dias pós cobertura (continua)													
		-1	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
66 (1° G1)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Oocistos	120	125	112	90	92	120	90	90	160	104	112	96	164	124
5 (2° G1)		120	120	120	156	112	100	100	145	120	100	116	104	104	112
239 (3° G1)		120	120	128	120	100	100	120	100	120	104	100	120	100	102
4 (4° G1)		160	96	108	120	104	96	120	100	168	124	120	84	112	100
184 (5° G1)		120	100	100	90	140	116	112	142	124	96	120	140	112	126
Média		128,00	112,20	113,60	115,20	109,60	106,40	108,40	115,40	138,40	105,60	113,60	108,80	118,40	112,80
10 (1° G2)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Taquizoítos	110	105	112	120	120	124	100	116	144	148	120	116	96	134
6 (2° G2)		120	124	112	120	100	120	105	140	120	116	104	116	120	100
22 (3° G2)		112	100	116	92	72	100	104	84	100	128	124	120	136	132
238 (4° G2)		112	120	140	132	160	172	124	112	124	124	132	144	160	NR
161 (5° G2)		112	120	120	92	88	100	92	84	108	114	96	80	100	96
Média		113,20	113,80	120,00	111,20	108,00	123,20	105,00	107,20	119,20	126,00	115,20	115,20	122,40	115,50
16	Controle	96	120	100	168	124	120	84	124	112	98	124	132	112	96
58		124	112	112	124	132	120	100	100	120	100	120	104	100	140
Média		110,00	116,00	106,00	146,00	128,00	120,00	92,00	112,00	116,00	99,00	122,00	118,00	106,00	118,00

NR - Animal eutanasiado

Tabela 25. Frequências cardíacas mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (continuação).

Número da Ovelha	Grupo da ovelha	Frequência cardíaca (bpm)/Dias pós cobertura (continuação)														
		77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154	161	168	
66 (1° G1)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Oocistos	104	108	112	108	104	124	112	100	96	112	72	100	112	124	
5 (2° G1)		104	104	112	116	112	112	100	160	120	124	108	NR	NR	NR	
239 (3° G1)		100	108	108	100	112	98	76	108	88	72	112	100	124	112	
4 (4° G1)		144	100	104	116	100	84	112	124	116	100	112	140	144	124	
184 (5° G1)		116	132	120	84	120	84	90	82	96	100	112	124	120	110	
Média		113,60	110,40	111,20	104,80	109,60	100,40	98,00	114,80	103,20	101,60	103,20	116,00	125,00	117,50	
10 (1° G2)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Taquizoítos	92	84	96	84	96	96	100	88	120	120	100	96	104	112	
6 (2° G2)		112	108	88	90	96	112	116	104	100	104	84	104	96	76	
22 (3° G2)		136	94	102	100	120	108	92	96	98	112	100	96	112	120	
238 (4° G2)		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
161 (5° G2)		80	100	96	100	94	100	96	80	91	84	92	72	88	92	
Média		105,00	96,50	95,50	93,50	101,50	104,00	101,00	92,00	102,25	105,00	94,00	92,00	100,00	100,00	
16	Controle	100	88	120	120	100	96	116	124	110	112	98	90	124	124	
58		144	100	104	116	100	98	124	128	119	124	132	140	140	132	
Média		122,00	94,00	112,00	118,00	100,00	97,00	120,00	126,00	114,50	118,00	115,00	115,00	132,00	128,00	

NR - Animal eutanasiado

Tabela 26. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro frequência cardíaca (bpm) de ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos *Toxoplasma gondii*.

Dias pré e pós-monta natural	Grupos Experimentais / Médias ¹ e Desvios Padrões						DTP*	
	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho inoculado com oocistos		Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho inoculado com taquizoítos		Controle		Valor de F	Pr > F
-1	128,0 ± 17,9	Aa	113,2 ± 3,9	Aa	110,0 ± 19,8	Aa	1,25	0,2886
3	112,2 ± 13,2	Aa	113,8 ± 10,6	Aa	116,0 ± 5,7	Aa	0,04	0,9643
5	113,6 ± 10,8	Aa	120,0 ± 11,7	Aa	106,0 ± 8,5	Aa	0,50	0,6044
7	115,2 ± 27,3	Ba	111,2 ± 18,2	Ba	146,0 ± 31,1	Aa	3,12	0,0461
11	109,6 ± 18,5	Aa	108,0 ± 33,9	Aa	128,0 ± 5,7	Aa	1,06	0,3497
14	106,4 ± 10,8	Aa	123,2 ± 29,4	Aa	120,0 ± 0,0	Aa	1,28	0,2810
21	108,4 ± 13,1	Aa	105,0 ± 11,8	Aa	92,0 ± 11,3	Aa	0,66	0,5170
28	115,4 ± 26,0	Aa	107,2 ± 23,7	Aa	112,0 ± 17,0	Aa	0,29	0,7506
35	138,4 ± 23,6	Aa	119,2 ± 16,8	Aa	116,0 ± 5,7	Aa	2,03	0,1335
42	105,6 ± 10,8	Aa	126,0 ± 13,6	Aa	99,0 ± 1,4	Aa	2,57	0,0788
49	113,6 ± 8,3	Aa	115,2 ± 14,8	Aa	122,0 ± 2,8	Aa	0,17	0,8399
56	108,8 ± 21,8	Aa	115,2 ± 22,9	Aa	118,0 ± 19,8	Aa	0,28	0,7590
63	118,4 ± 26,0	Aa	122,4 ± 26,5	Aa	106,0 ± 8,5	Aa	0,66	0,5201
70	112,8 ± 12,0	Aa	115,5 ± 20,3	Aa	118,0 ± 31,1	Aa	0,07	0,9305
77	113,6 ± 18,0	Aa	105,0 ± 24,5	Aa	122,0 ± 31,1	Aa	0,70	0,5001
84	110,4 ± 12,5	Aa	96,5 ± 10,1	Aa	94,0 ± 8,5	Aa	1,02	0,3619
91	111,2 ± 5,9	Aa	95,5 ± 5,7	Aa	112,0 ± 11,3	Aa	1,10	0,3347
98	104,8 ± 13,4	Aa	93,5 ± 7,9	Aa	118,0 ± 2,8	Aa	1,41	0,2471
105	109,6 ± 7,8	Aa	101,5 ± 12,4	Aa	100,0 ± 0,0	Aa	0,35	0,7064
112	100,4 ± 17,6	Aa	104,0 ± 7,3	Aa	97,0 ± 1,4	Aa	0,12	0,8883
119	98,0 ± 15,4	Aa	101,0 ± 10,5	Aa	120,0 ± 5,7	Aa	1,22	0,2964
126	114,8 ± 29,4	ABa	92,0 ± 10,3	Ba	126,0 ± 2,8	Aa	3,23	0,0413
133	103,2 ± 14,0	Aa	102,3 ± 12,4	Aa	114,5 ± 6,4	Aa	0,39	0,6804
140	101,6 ± 19,3	Aa	105,0 ± 15,4	Aa	118,0 ± 8,5	Aa	0,66	0,5176
147	103,2 ± 17,5	Aa	94,0 ± 7,7	Aa	115,0 ± 24,0	Aa	1,02	0,3614
154	116,0 ± 19,6	Aa	92,0 ± 13,9	Aa	115,0 ± 35,4	Aa	2,29	0,1037
161	125,0 ± 13,6	ABa	100,0 ± 10,3	Ba	132,0 ± 11,3	Aa	3,16	0,0443
168	117,5 ± 7,5	Aa	100,0 ± 19,9	Aa	128,0 ± 5,7	Aa	2,05	0,1311
DDT**	Valor de F	1,23	1,55	0,98				
	Pr > F	0,2048	0,0568	0,5029				

1: Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ($P > 0,05$)

*: Desdobramento dos tratamentos dentro de cada dia.

**.: Desdobramento dos dias dentro de cada Tratamento

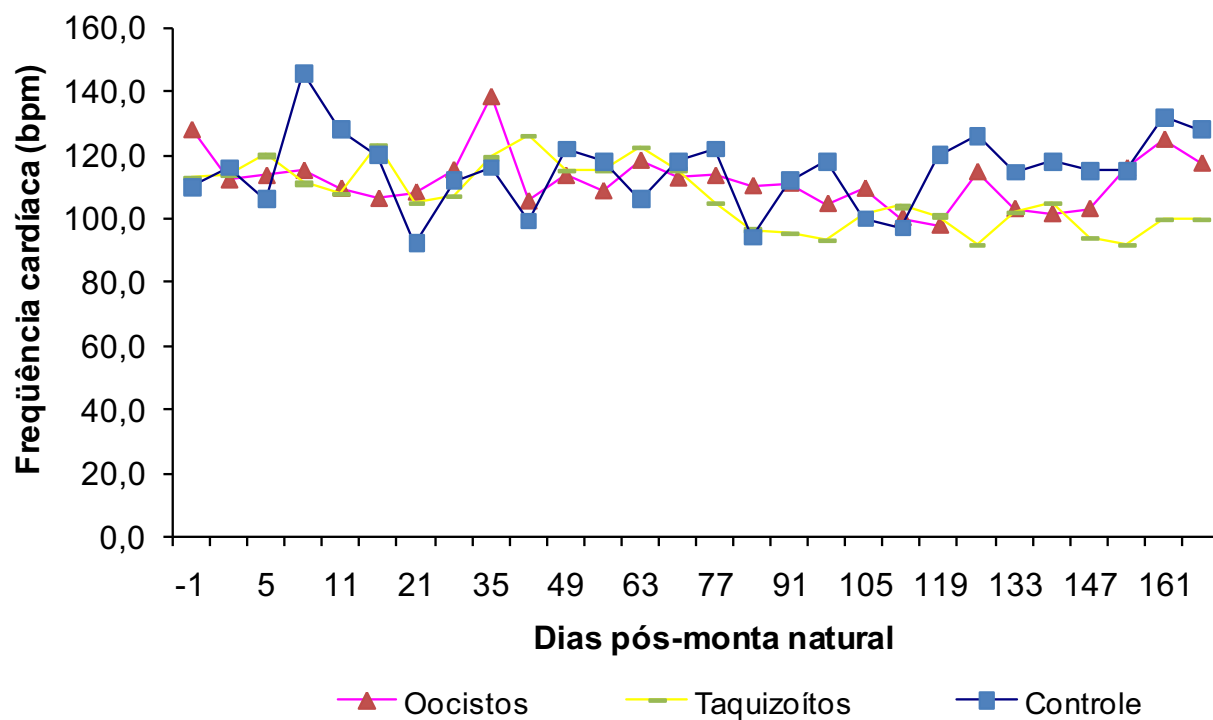


Figura 20. Frequências cardíacas média mensuradas nas ovelhas após a monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

5.13.2.3 - Frequência respiratória

Com base nos resultados encontrados, verificou-se um aumento da frequência respiratória (taquipnéia) em todas as ovelhas principalmente no terço final de gestação. Tal fato pode ser correlacionado com a diminuição de espaço da cavidade abdominal, devido à presença dos fetos, refletindo, assim, diretamente no aumento dos movimentos respiratórios. Tais resultados estão registrados nas Tabelas 27, 28 e Figura 21.

Tabela 27. Frequências respiratórias mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (continua).

Número da Ovelha	Grupo da ovelha	Frequências respiratórias (mpm)/Dias pós cobertura (continua)													
		-1	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
66 (1° G1)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Oocistos	28	32	28	40	32	32	28	24	28	28	28	28	24	26
5 (2° G1)		22	24	28	24	28	24	24	24	32	28	24	20	24	28
239 (3° G1)		28	28	32	24	24	28	24	24	32	28	24	28	48	40
4 (4° G1)		48	40	40	40	40	40	48	40	40	40	28	32	40	32
184 (5° G1)		32	36	32	36	24	40	40	32	32	32	44	50	40	36
Média		31,60	32,00	32,00	32,80	29,60	32,80	33,60	28,80	32,80	31,20	29,60	31,60	35,20	32,40
10 (1° G2)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Taquizoítos	32	26	40	24	26	28	28	28	20	28	24	24	24	24
6 (2° G2)		24	48	36	32	28	28	28	24	24	24	24	24	28	28
22 (3° G2)		24	24	36	28	20	32	28	28	28	28	26	32	40	40
238 (4° G2)		24	24	28	32	24	28	26	28	44	40	40	40	44	NR
161 (5° G2)		28	32	36	28	32	44	32	36	28	32	32	32	32	45
Média		26,40	30,80	35,20	28,80	26,00	32,00	28,40	28,80	28,80	30,40	30,00	30,40	33,60	34,25
16	Controle	36	36	32	34	26	38	40	32	32	34	30	24	26	
58		24	36	28	26	28	32	40	32	28	28	24	48	38	
Média		30,00	36,00	30,00	30,00	27,00	35,00	40,00	32,00	30,00	31,00	27,00	36,00	32,00	

NR - Animal eutanasiado

Tabela 27. Frequências respiratórias mensuradas nas ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (continuação).

Número da Ovelha	Grupo da ovelha	Frequências respiratórias (mpm)/Dias pós cobertura (continuação)														
		77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154	161	168	
66 (1° G1)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Oocistos	40	40	28	40	40	28	40	32	30	48	44	36	28	40	
5 (2° G1)		32	36	32	28	32	28	24	28	36	50	48	NR	NR	NR	
239 (3° G1)		40	40	36	36	30	48	36	32	36	44	28	44	32	36	
4 (4° G1)		32	36	64	40	71	64	68	40	36	40	38	42	40	42	
184 (5° G1)		44	41	60	80	40	32	44	44	44	42	44	44	42	44	
Média		37,60	38,60	44,00	44,80	42,60	40,00	42,40	35,20	36,40	44,80	40,40	41,50	35,50	40,50	
10 (1° G2)	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com Taquizoítos	24	36	32	24	26	20	28	32	24	32	32	24	28	32	
6 (2° G2)		32	36	32	24	26	32	28	32	26	32	36	36	44	44	
22 (3° G2)		32	32	28	68	52	52	32	46	44	42	40	44	42	46	
238 (4° G2)		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
161 (5° G2)		30	48	52	40	32	64	40	52	42	40	46	48	50	48	
Média		29,50	38,00	36,00	39,00	34,00	42,00	32,00	40,50	34,00	36,50	38,50	38,00	41,00	42,50	
16	Controle	32	38	40	32	26	24	20	28	36	40	44	38	38	40	
58		32	32	36	44	32	44	44	32	36	44	28	48	50	42	
Média		32,00	35,00	38,00	38,00	29,00	34,00	32,00	30,00	36,00	42,00	36,00	43,00	44,00	41,00	

NR - Animal eutanasiado

Tabela 28. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro frequência respiratória (mpm) de ovelhas expostas à monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos *Toxoplasma gondii*.

Dias pré e pós-monta natural	Grupos Experimentais / Médias ¹ e Desvios Padrões						DTP*	
	Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho inoculado com oocistos		Ovelhas submetidas à monta natural pelo macho inoculado com taquizoítos		Controle		Valor de F	Pr > F
-1	31,6 ± 9,8	Aa	26,4 ± 3,6	Aa	30,0 ± 8,5	Aa	0,42	0,6556
3	32,0 ± 6,3	Aa	30,8 ± 10,2	Aa	36,0 ± 0,0	Aa	0,24	0,7889
5	32,0 ± 4,9	Aa	35,2 ± 4,4	Aa	30,0 ± 2,8	Aa	0,29	0,7499
7	32,8 ± 8,2	Aa	28,8 ± 3,3	Aa	30,0 ± 5,7	Aa	0,25	0,7784
11	29,6 ± 6,7	Aa	26,0 ± 4,5	Aa	27,0 ± 1,4	Aa	0,20	0,8153
14	32,8 ± 7,2	Aa	32,0 ± 6,9	Aa	35,0 ± 4,2	Aa	0,08	0,9245
21	33,6 ± 10,0	Aa	28,4 ± 2,2	Aa	39,0 ± 0,0	Aa	1,24	0,2921
28	28,8 ± 7,2	Aa	28,8 ± 4,4	Aa	32,0 ± 1,4	Aa	0,10	0,9011
35	32,8 ± 4,4	Aa	28,8 ± 9,1	Aa	30,0 ± 2,8	Aa	0,25	0,7784
42	31,2 ± 5,2	Aa	30,4 ± 6,1	Aa	31,0 ± 4,2	Aa	0,01	0,9899
49	29,6 ± 8,3	Aa	30,0 ± 6,3	Aa	30,0 ± 2,8	Aa	0,00	0,9972
56	31,6 ± 11,2	Aa	30,4 ± 6,7	Aa	27,0 ± 4,2	Aa	0,18	0,8314
63	35,2 ± 10,7	Aa	33,6 ± 8,3	Aa	36,0 ± 17,0	Aa	0,07	0,9370
70	32,4 ± 5,7	Aa	34,3 ± 9,9	Aa	32,0 ± 8,5	Aa	0,06	0,9405
77	37,6 ± 5,4	Aa	29,5 ± 3,8	Aa	32,0 ± 0,0	Aa	0,93	0,3959
84	38,6 ± 2,4	Aa	38,0 ± 6,9	Aa	35,0 ± 4,2	Aa	0,12	0,8906
91	44,0 ± 16,7	Aa	36,0 ± 10,8	Aa	38,0 ± 2,8	Aa	0,93	0,3968
98	44,8 ± 20,3	Aa	39,0 ± 20,8	Aa	38,0 ± 8,5	Aa	0,63	0,5311
105	42,6 ± 16,5	Aa	34,0 ± 12,3	Aa	29,0 ± 4,2	Aa	1,96	0,1433
112	40,0 ± 15,7	Aa	42,0 ± 19,7	Aa	34,0 ± 14,1	Aa	0,53	0,5902
119	42,4 ± 16,1	Aa	32,0 ± 5,7	Aa	32,0 ± 17,0	Aa	1,80	0,1674
126	35,2 ± 6,6	Aa	40,5 ± 10,1	Aa	30,0 ± 2,8	Aa	0,95	0,3877
133	36,4 ± 5,0	Aa	34,0 ± 10,5	Aa	36,0 ± 0,0	Aa	0,08	0,9208
140	44,8 ± 4,1	Aa	36,5 ± 5,3	Aa	42,0 ± 2,8	Aa	0,94	0,3911
147	40,4 ± 7,8	Aa	38,5 ± 6,0	Aa	36,0 ± 11,3	Aa	0,18	0,8393
154	41,5 ± 3,8	Aa	38,0 ± 10,6	Aa	43,0 ± 7,1	Aa	0,25	0,7769
161	35,5 ± 6,6	Aa	41,0 ± 9,3	Aa	44,0 ± 8,5	Aa	0,69	0,5014
168	40,5 ± 3,4	Aa	42,5 ± 7,2	Aa	41,0 ± 1,4	Aa	0,05	0,9500
DDT**	Valor de F	1,51	1,25	0,56				
	Pr > F	0,0569	0,1900	0,9614				

1: Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer (P>0,05)

*: Desdobramento dos tratamentos dentro de cada dia.

** : Desdobramento dos dias dentro de cada Tratamento

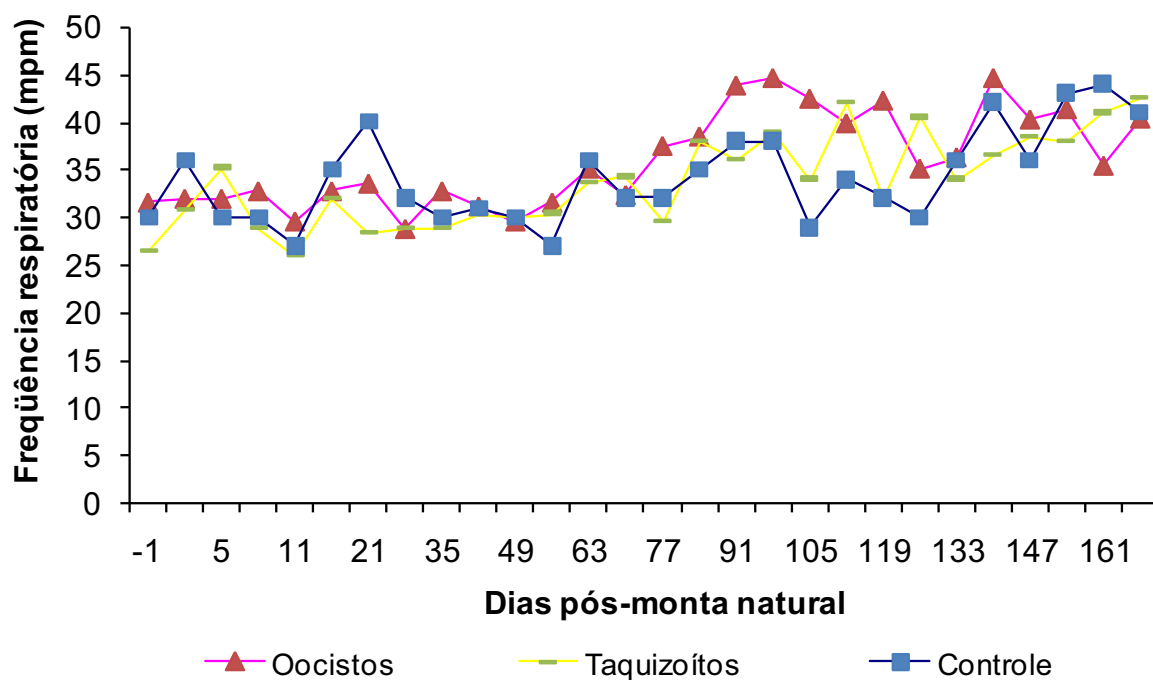


Figura 21. Frequências respiratórias média mensuradas nas ovelhas após a monta natural pelo reprodutor não inoculado (controle) e pelos infectados com $2,0 \times 10^5$ oocistos ou com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

5.14 - Resposta Imune Humoral das Fêmeas

Analisando a Tabela 29 observa-se que as ovelhas foram monitoradas quanto à presença de anticorpos específicos contra *T. gondii*, desde o 30º dia que antecedeu a monta natural, das mesmas, por ovinos machos não infectado (controle), ou inoculados pelo protozoário supracitado. Pelos resultados obtidos, verifica-se que duas fêmeas montadas naturalmente pelo macho inoculado com oocistos e três pelo macho infectado com taquizoítos, apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* a partir do 3º ou 5º dia pós-monta natural (DPMN), respectivamente. Título sorológico máximo (4096) foi detectado nas cinco ovelhas naturalmente infectadas, após monta natural. Embora tenham ocorrido alterações nos títulos de anticorpos destas cinco fêmeas no decorrer do experimento, decréscimos acentuados destes títulos foram observados a partir do 105º e 112º DPMN para as duas ovelhas do grupo 1 (oocistos) e a partir do 126º DPMN para ovelhas expostas à monta natural pelo macho inoculado com taquizoítos de *T. gondii*. Convém salientar que apesar de ter ocorrido decréscimo nos títulos sorológicos destas ovelhas, as mesmas continuaram apresentando, até o parto, anticorpos específicos anti-*T. gondii* (Tabela 29).

É importante relatar que as duas ovelhas pertencentes ao grupo controle (16 e 58), três do G1 (oocistos- 66, 239 e 4) e duas do G2 (taquizoítos – 10 e 22) não apresentaram anticorpos contra *T. gondii*, ao longo de todo o período experimental (pré e pós-monta natural).

Tabela 29. Reciproca dos títulos sorológicos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em ovelhas expostas à monta natural pelos machos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, ou pelo macho não inoculado (controle).

Dia pré e pós-monta natural	Reciproca dos títulos sorológicos												
	N° ovelhas submetidas à monta natural pelo macho inoculado com oocistos						N° ovelhas submetidas à monta natural pelo macho inoculado com taquizoitos						
	(1° G1)	(2° G1)	(3° G1)	(4° G1)	(5° G1)		(1° G2)	(2° G2)	(3° G2)	(4° G2)	(5° G2)	(1° G3)	(2° G3)
-30	-	-	-	-	-	184	10	6	22	238	161	16	58
-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	64	64	-	-	-	-	64	-	-
5	-	64	-	-	64	64	-	64	-	64	64	-	-
7	-	64	-	-	64	64	-	64	-	64	64	-	-
11	-	64	-	-	64	64	-	64	-	64	64	-	-
14	-	64	-	-	64	64	-	256	-	256	64	-	-
21	-	1024	-	-	64	64	-	256	-	256	256	-	-
28	-	256	-	-	256	256	-	64	-	1024	64	-	-
35	-	528	-	-	528	528	-	256	-	1024	64	-	-
42	-	1024	-	-	4096	4096	-	256	-	4096	1024	-	-
49	-	4096	-	-	256	256	-	1024	-	4096	1024	-	-
56	-	528	-	-	64	64	-	4096	-	4096	1024	-	-
63	-	1024	-	-	256	256	-	256	-	1024	1024	-	-
70	-	256	-	-	256	256	-	256	-	1024	1024	-	-
77	-	256	-	-	256	256	-	256	-	NR	528	-	-
84	-	1024	-	-	256	256	-	64	-	NR	4096	-	-
91	-	1024	-	-	256	256	-	64	-	NR	4096	-	-
98	-	256	-	-	256	256	-	256	-	NR	1024	-	-
105	-	1024	-	-	64	64	-	64	-	NR	4096	-	-
112	-	256	-	-	64	64	-	64	-	NR	1024	-	-
119	-	256	-	-	64	64	-	64	-	NR	1024	-	-
126	-	256	-	-	64	64	-	256	-	NR	256	-	-
133	-	64	-	-	64	64	-	64	-	NR	64	-	-
140	-	64	-	-	64	64	-	64	-	NR	64	-	-
147	-	64	-	-	64	64	-	64	-	NR	64	-	-
154	-	NR	-	-	64	64	-	64	-	NR	64	-	-
161	-	NR	-	-	64	64	-	64	-	NR	64	-	-
168	-	NR	-	-	64	64	-	64	-	NR	64	-	-

-- = Sorologia negativa

NR = Não realizado - Animal Eutanasiado (Parto e/ou Desordem reprodutiva)

5.15 - Resposta Imune Humoral dos filhotes

É importante frisar que todas as fêmeas tiveram diagnóstico de gestação confirmada, por meio de ultrassonografia, realizada 40 dias após a monta natural.

Pela Tabela 30, verifica-se que dos oito cordeiros, filhotes das fêmeas naturalmente infectadas (via sêmen – Monta Natural) por *T. gondii*, cinco apresentaram títulos de anticorpos contra este coccídio, logo ao nascimento. Esta primeira colheita de sangue foi realizada antes que os cordeiros ingerissem o colostro. Tal fato comprova que o contato que estes animais tiveram com *T. gondii*, ocorreu durante a gestação. Os anticorpos, nestes cinco cordeiros, mantiveram-se presentes até o 10º dia de vida, quando os mesmos foram eutanasiados para posterior pesquisa de *T. gondii* por meio de outras técnicas.

Tabela 30. Recíproca dos títulos sorológicos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) dos filhotes das ovelhas expostas à monta natural pelos machos infectados com $2,5 \times 10^5$ oocistos ou com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii* ou pelo não inoculado (controle).

Grupo	Nº da ovelha	Nº do filhote	Recíproca dos títulos sorológicos	
			Dia pós parto	
			Zero (antes da 1ª amamentação)	10
Oocistos	66	66 - F1	-	-
	5	5 (F1)	256	256
		5 (F2)	64	64
		5 (F3)	-	-
	239	239 (F1)	-	-
		239 (F2)	-	-
	4	4 (F1)	-	-
	184	184 (F1)	64	64
184 (F2)		256	64	
Taquizoítos	10	10 (F1)	-	-
		10 (F2)	-	-
	6	6 (F1)	-	-
	22	22 (F1)	-	-
	238	239 (F1)	NR*	NR*
	161	161 (F1)	528	256
Controle	16	16 (F1)	-	-
	58	58 (F1)	-	-
		58 (F2)	-	-

- = Sorologia negativa

NR* = Não realizado - Feto macerado

5.16 - Determinação da parasitemia nas ovelhas

A camada leucocitária de cada amostra sanguínea obtida das ovelhas foi inoculada intraperitonealmente em cinco camundongos, conforme descrito no item 3.19.3. A parasitemia foi determinada de forma indireta, pela sorologia dos camundongos inoculados (≥ 64), e direta pela presença de cistos contendo bradizoítos deste parasito. Surtos parasitêmicos foram detectados, nas cinco ovelhas naturalmente infectadas, via sêmen, por *T. gondii* (Tabela 31). No 11º, 56º, 98º e 133º dias pós-monta natural (DPMN) para a 2ª ovelha (5) e no 77º DPMN para 5ª fêmea expostas à monta natural pelo macho inoculado com oocistos. Nas fêmeas submetidas à monta natural pelo macho infectado com taquizoítos, surtos parasitêmicos puderam ser observados para a segunda fêmea (6) pertencente a este grupo no 7º, 21º, 28º e 56º DPMN, no 56º e 63º DPMN para a quarta fêmea (238) e no 84º, 105º e 119º DPMN para a quinta fêmea naturalmente infectada, via sêmen, por *T. gondii* (161). Na Tabela 31, estão registrados estes achados.

5.17 - Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos das ovelhas reprodutoras

5.17.1 - Exames anatomo e histopatológicos das ovelhas reprodutoras

Das cinco ovelhas naturalmente infectadas por *T. gondii* via sêmen (RIFI), apenas a quarta fêmea (238), submetida à monta natural pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos), apresentou feto macerado no 65º DPMN (Figura 22). Imediatamente, após a detecção desta anormalidade reprodutiva, esta ovelha foi necropsiada, objetivando a pesquisa de *T. gondii* nos tecidos por meio da técnica histopatológica, pelo bioensaio e pela PCR. Nas demais ovelhas, inclusive nas do grupo controle, e em seus respectivos filhotes, não foram observadas qualquer alteração gestacional que pudesse ser atribuída ao *Toxoplasma gondii*.

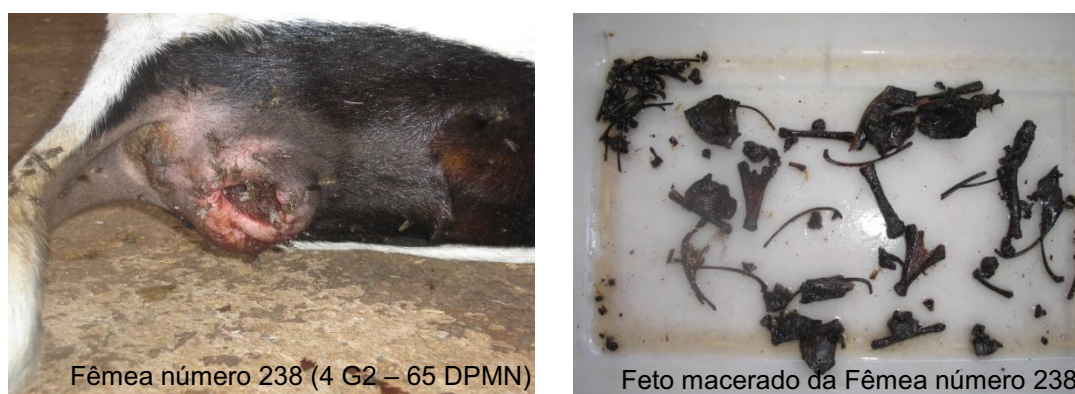


Figura 22. Fotografia da ovelha número 238 com 65 dias de gestação, sorologicamente positiva para *Toxoplasma gondii* após ser exposta à monta natural pelo ovino 1234 (inoculado com taquizoítos).

Dos exames histopatológicos realizados nas cinco ovelhas que soroconverteram (RIFI), após a monta natural, necropsiadas 10 dias após o parto, somente na fêmea de número 238, que apresentou feto macerado no 65º DPMN, foi possível diagnosticar a presença de cisto de *T. gondii* por meio desta técnica (Figura 23). Os exames histopatológicos das quatro reprodutoras soropositivas restantes foram negativos para presença de *T. gondii*. Entretanto, observou-se, em algumas destas, infiltrado inflamatório mononuclear perivascular com migração e diapedese no coração, miocardite focal em musculatura cardíaca, miocardite em musculatura esquelética, infiltrado poli e mononuclear moderado na vagina, infiltrado poli e mononuclear moderado difuso na submucosa do útero, vaginite e metrite. Salienta-se, que tais lesões não foram observadas nas outras cinco ovelhas, submetidas à monta natural, que não soroconverteram para *T. gondii* e nas duas fêmeas pertencentes ao grupo controle. Das proles destas cinco fêmeas positivas para

toxoplasmose, foi possível diagnosticar em alguns, pneumonia, infiltrado polimorfonuclear no cérebro e reação linfocitária no baço (Tabela 32).

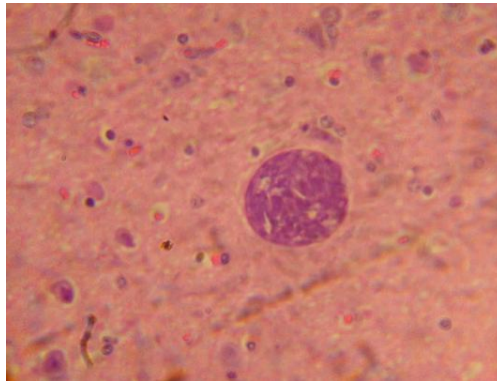
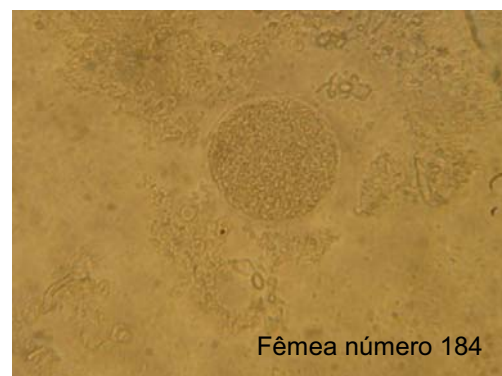
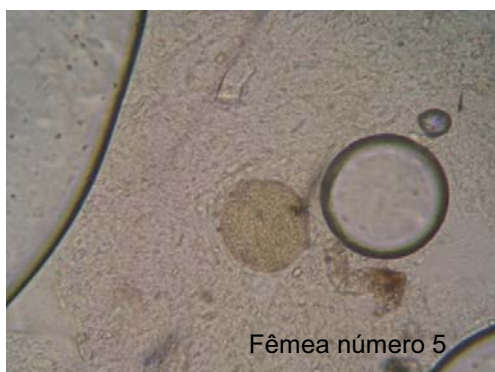


Figura 23. Cisto de *Toxoplasma gondii* detectado pela técnica histopatológica em cérebro da ovelha 238, sorologicamente positiva para *Toxoplasma gondii* após ter sido exposta à monta natural pelo ovino 1234 (inoculado com taquizoítos) 40X.

5.17.2 - Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos das ovelhas e em seus respectivos filhotes pelo bioensaio

Foi possível detectar parasitismo tissular por *T. gondii* (presença de diversos cistos cerebrais contendo bradizoítos), tanto em camundongos inoculados com o “pool” de tecidos (musculatura esquelética e cardíaca, cérebro/cerebelo, retina, baço, fígado, útero, vagina, ovário e placenta) das cinco ovelhas naturalmente infectadas (após a monta natural), quanto em camundongos inoculados com o “pool” de tecidos (musculatura esquelética e cardíaca, cérebro/cerebelo, retina, baço, fígado) dos cinco filhotes soropositivos das respectivas fêmeas (Figura 24).



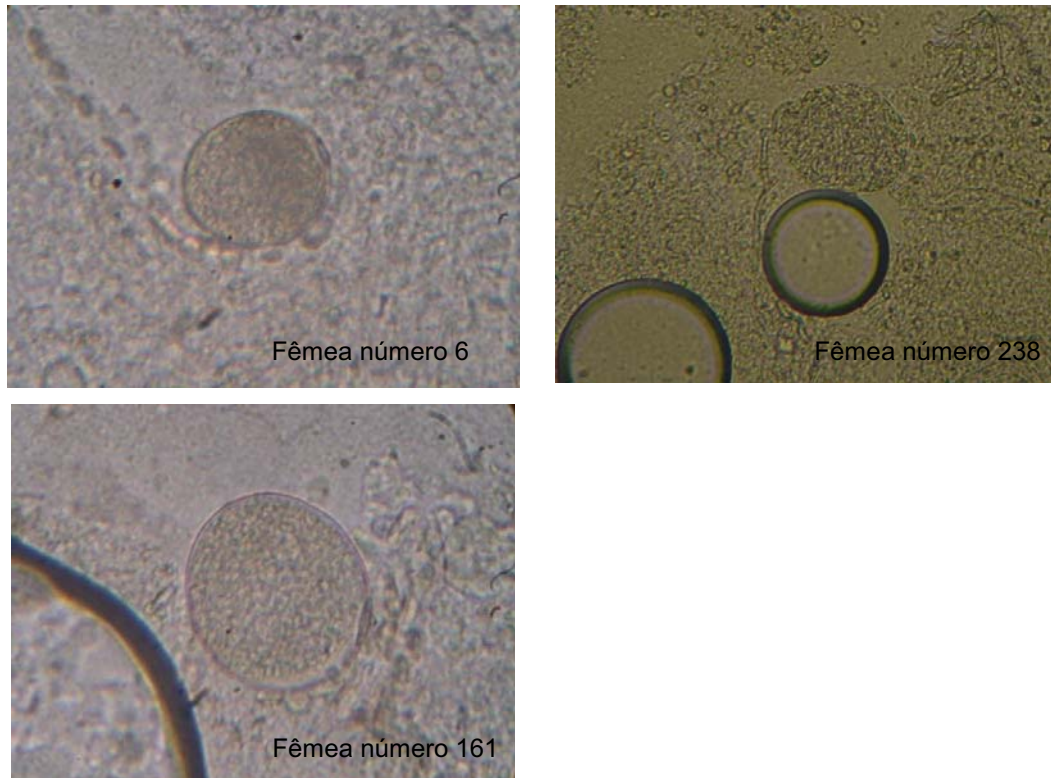


Figura 24. Cistos de *Toxoplasma gondii* em cérebros de camundongos inoculados com “pool” de tecidos de ovelhas naturalmente infectadas, após terem sido expostas à monta natural, por ovinos inoculados com oocistos ou taquizoítos deste coccídio. Obj. 40x.

5.17.3 - Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos das ovelhas e de seus respectivos filhotes pela PCR

As Figuras 25 e 26, ilustram a presença/ausência do DNA de *T. gondii* do “pool” de tecidos (musculatura esquelética e cardíaca, cérebro/cerebelo, retina, baço, fígado, útero, vagina, ovário e placenta) de cada ovelha e de seus respectivos filhotes pertencentes aos grupos 1 (ovelhas submetidas à monta natural pelo macho infectado com oocistos de *T. gondii*), 2 (ovelhas expostas à monta natural pelo macho infectado com taquizoítos de *T. gondii*), e 3 (ovelhas expostas à monta natural pelo ovino não inoculado - controle), respectivamente. Verifica-se que, para ovelhas do G1, foi possível, por meio desta técnica, diagnosticar a presença do DNA do presente parasito na segunda fêmea (5) montada naturalmente pelo macho 1224 (inoculado com oocistos) e também no pool de tecidos dos filhotes da quinta fêmea (184) montada naturalmente pelo mesmo reprodutor experimentalmente infectado. No grupo das ovelhas expostas à monta natural pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos), foi possível visualizar a amplificação do DNA de 194 pares

de base deste coccídio na quarta (238) e quinta (161) fêmeas submetidas à monta natural pelo ovino supracitado.

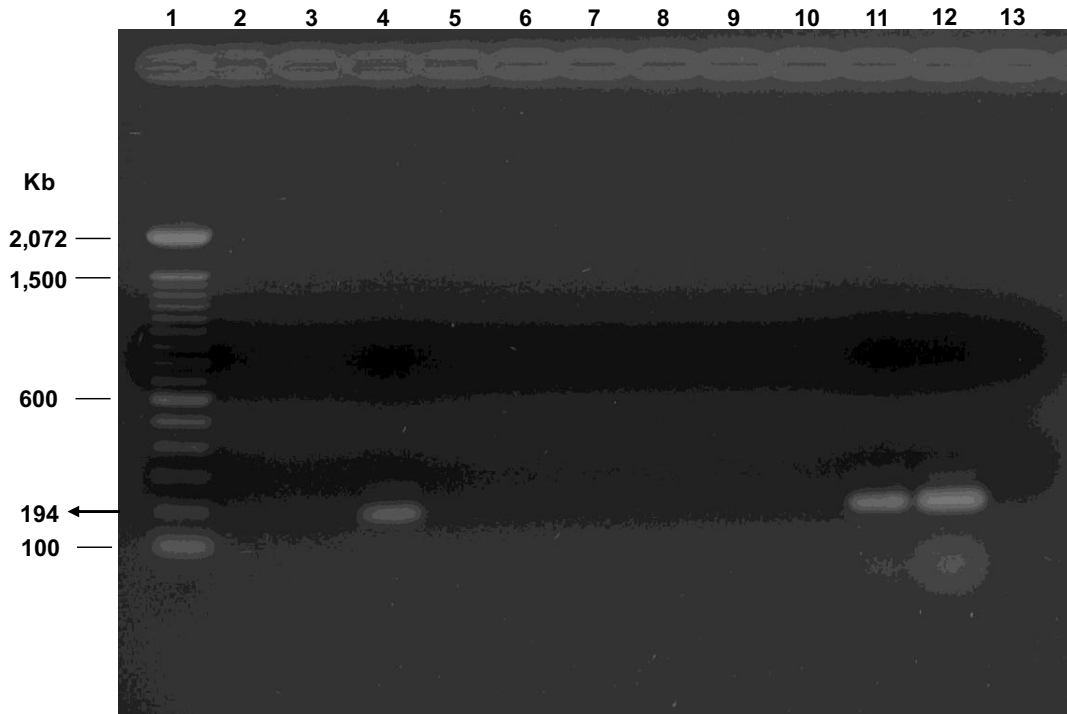


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do “pool” das amostras de tecidos das ovelhas naturalmente infectadas ou não, via sêmen pelo macho infectado com oocistos de *Toxoplasma gondii*, e seus respectivos filhotes. (1) Marcador de peso molecular DNA Ladder (100bp). (2) Ovelha 66 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos). (3) Filhote da Ovelha 66 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos). (4) Ovelha 5 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos). (5) Filhotes da Ovelha 5 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos) (6) Ovelha 239 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos). (7) Filhotes da ovelha 239 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos). (8) Ovelha 4 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos). (9) Filhote da ovelha 4 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos) (10) Ovelha 184 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos). (11) Filhotes da ovelha 184 montada pelo macho 1224 (inoculado com oocistos). (12) Controle positivo. (13) Controle negativo - pool de tecidos da ovelha 16 e seu respectivo filhote.

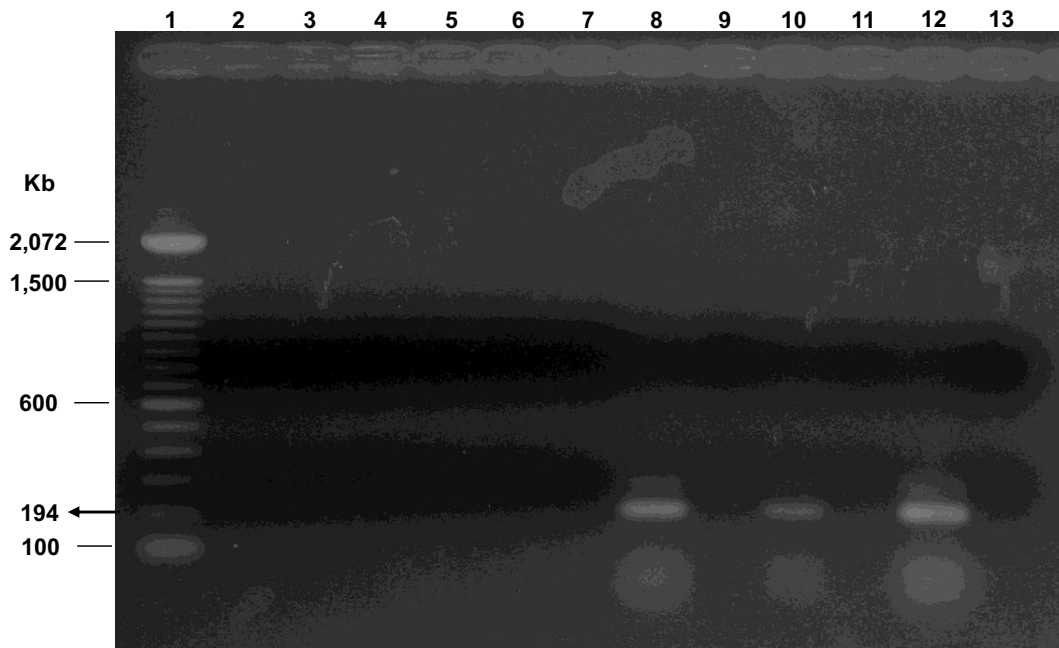


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do “pool” das amostras de tecidos das ovelhas naturalmente infectadas ou não, via sêmen pelo macho infectado com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, e seus respectivos filhotes. (1) Marcador de peso molecular DNA Ladder (100bp). (2) Ovelha 10 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (3) Filhotes da Ovelha 10 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (4) Ovelha 6 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (5) Filhote da Ovelha 6 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos) (6) Ovelha 22 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (7) Filhote da ovelha 22 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (8) Ovelha 238 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (9) Filhote da ovelha 238 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (10) Ovelha 161 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (11) Filhote da ovelha 161 montada pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos). (12) Controle positivo. (13) Controle negativo – pool de tecidos da ovelha 58 e seus respectivos filhotes.

Tabela 33. Resumo dos resultados, encontrados no presente trabalho, referentes ao diagnóstico e isolamento de *Toxoplasma gondii*, tanto em amostras seminais dos ovinos reprodutores, quanto nos tecidos das fêmeas expostas à monta natural e de seus respectivos filhotes.

Grupo 1									
Técnica de diagnóstico utilizada	Ovino 1224 inoculado com $2,0 \times 10^5$ oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> /Dias, pós inoculação, das colheitas de sêmen e em que realizou a monta natural nas respectivas fêmeas								
	35	42	49	56	63				
Bioprova	+	+	-	-	+				
PCR	-	+	-	-	-				
	Número das ovelhas submetidas à monta natural pelo ovino inoculado com $2,0 \times 10^5$ oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>								
	66	5	239	4	184				
RIFI	-	+	-	-	+				
Histopatologia	-	-	-	-	-				
Bioprova	-	+	-	-	+				
PCR	-	+	-	-	-				
	Respectivos filhotes das ovelhas submetidas à monta natural pelo ovino inoculado com $2,0 \times 10^5$ oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>								
	F1	F1	F2	F3	F1	F2	F1	F1	F2
RIFI	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Histopatologia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bioprova	-	+	+	-	-	-	-	+	+
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Grupo 2									
Técnica de diagnóstico utilizada	Ovino 1234 inoculado com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> /Dias, pós inoculação, das colheitas de sêmen e em que realizou a monta natural nas respectivas								
	11	14	21	49	70				
Bioprova	+	-	-	+	+				
PCR	-	-	-	-	-				
	Número das ovelhas submetidas à monta natural pelo ovino inoculado com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>								
	10	6	22	238	161				
RIFI	-	+	-	+	+				
Histopatologia	-	-	-	+	-				
Bioprova	-	+	-	+	+				
PCR	-	-	-	+	+				
	Respectivos filhotes das ovelhas submetidas à monta natural pelo ovino inoculado com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>								
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	
RIFI	-	-	-	-	NR*	-	NR*	+	
Histopatologia	-	-	-	-	NR*	-	NR*	-	
Bioprova	-	-	-	-	NR*	-	NR*	+	
PCR	-	-	-	-	NR*	-	NR*	-	
Grupo 3									
Técnica de diagnóstico utilizada	Ovino 546 pertencente ao grupo controle/Dias, pós inoculação, das colheitas de sêmen e em que realizou a monta natural nas respectivas fêmeas								
	Entre 1 e 35				Entre 36 e 70				
Bioprova	-				-				
PCR	-				-				
	Número das ovelhas submetidas à monta natural pelo ovino pertencente ao grupo controle								
	16				58				
RIFI	-				-				
Histopatologia	-				-				
Bioprova	-				-				
PCR	-				-				
	Respectivos filhotes das ovelhas submetidas à monta natural pelo ovino pertencente ao grupo controle								
	F1				F1				
RIFI	-				-				
Histopatologia	-				-				
Bioprova	-				-				
PCR	-				-				

* Não realizado - Feto macerado

6. - DISCUSSÃO

6.1. Discussão – Obtenção de oocistos e seleção dos ovinos

A obtenção de oocistos do presente estudo, por meio da utilização de gatos jovens experimentalmente infectados com cistos de *T. gondii*, mostrou comportamento biológico (período pré-patente e pico de eliminação) semelhante aos resultados encontrados por FRENKEL et al. (1970), COSTA et al. (1977), VIDOTTO & COSTA (1987), KANETO (1997), OLIVEIRA et al., (2001), SCARPELLI (2001), MOURA (2004) e ARANTES (2005). Os critérios utilizados na identificação destes oocistos (ZAMAN, 1970; DUBEY et al., 1972), não deixam dúvidas quanto a sua etiologia. Tal identificação é de suma importância, uma vez que oocistos muito semelhantes aos de *T. gondii*, entretanto, pertencentes a outros coccídios, também utilizam os felídeos como hospedeiros definitivos (DUBEY, 1977).

Apesar do pequeno número de ovinos examinados (32 machos e 67 fêmeas), os resultados referentes aos exames sorológicos (RIFI) realizados preliminarmente (seleção) em reprodutores e reprodutoras da microrregião de Jaboticabal, evidenciam que o *T. gondii*, está amplamente disseminado, nesta categoria animal, na região estudada. Corroboram com estes achados, os resultados encontrados por LOPES et al. (2010), onde estes autores, estudando a soroprevalência associada aos fatores de risco da toxoplasmose para ovinos da microrregião de Jaboticabal, diagnosticaram que 52,05% do rebanho analisado, apresentaram anticorpos específicos anti-*T. gondii*

Os exames clínicos e sorológicos, realizados durante o período pré-experimental nos reprodutores (antes da inoculação com oocistos ou taquizoítos) e nas reprodutoras (antes da monta natural), não deixam dúvidas quanto à sanidade dos animais utilizados nesta pesquisa. Portanto, os ovinos selecionados (machos e fêmeas) além de não terem tido contato prévio com *T. gondii*, não apresentaram qualquer outra infecção que pudesse interferir no experimento.

6.2. Discussão - Machos

A infecção experimental com *T. gondii* dos ovinos reprodutores utilizados nesta pesquisa, após a inoculação de oocistos ou taquizoítos de *T. gondii*, confirmou-se pela soroconversão dos dois animais inoculados. Sinais clínicos como hipertermia, apatia, anorexia e fezes amolecidas, foram observados, entre o 3º e 11º DPI, tanto no reprodutor que recebeu oocistos (cepa P) quanto naquele infectado com taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH). Resultados semelhantes foram obtidos por LOPES (2007). Este autor observou sinais clínicos, entre o 5º e 7º DPI, em três ovinos inoculados com oocistos (cepa P) de *T. gondii*.

Neste caso, o autor relatou que os ovinos infectados com taquizoítos (cepa RH) apresentaram, de modo geral, um quadro assintomático para toxoplasmose.

Utilizando uma amostra de *T. gondii* (cepa não mencionada) isolada de um caso natural, COLE et al. (1954), inocularam (via não descrita) 10 ovelhas e três cordeiros. O período de incubação variou de um a seis dias, e os sinais clínicos mais freqüentes em nove ovelhas e nos três cordeiros foram febre, dispnéia e incoordenação motora. Neste caso, a infecção foi fatal em duas ovelhas e em um cordeiro.

GARNHAN & LIAISON (1960) infectaram cordeiros com duas semanas de idade, com aproximadamente 100 cistos de *T. gondii* (cepa não mencionada), pelas vias intraperitoneal (IP), endovenosa (EV) e oral (VO). Sinais clínicos não foram observados, mas de duas semanas até nove meses pós-inoculação, anticorpos contra-*T. gondii* foram detectados, utilizando-se a reação de Sabin & Feldman, nos ovinos inoculados.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos contra-*T. gondii*, em ovinos, é recomendada por NETO et al. (2008). Outros autores (MANROPOT & BOTROS 1972; COSTA et al., 1978; SOARES et al., 2009), também utilizam e recomendam esta reação para ruminantes. NETO et al. (2008); SOARES et al. (2009) e PINHEIRO et al. (2009) estabeleceram para ovinos que títulos iguais e/ou acima de 64 são indicativos de contato prévio com *T. gondii*. Considerando este limiar sorológico, para a avaliação de resposta humoral dos ovinos experimentais, verifica-se que os dois reprodutores inoculados com oocistos ou taquizoítos de *T. gondii* responderam rapidamente ao estímulo antigênico, apresentando títulos sorológicos superiores ou iguais a 64 a partir 5º DPI. Título sorológico máximo (4096) foi detectado nos ovinos infectados com *T. gondii*, de ambos os grupos, em diversas datas pós-inoculação. Embora tenham ocorrido alterações nos títulos de anticorpos no decorrer do experimento, decréscimos acentuados destes foram observados apenas a partir do 63º e 70º DPI no ovino do grupo 1 (oocistos) e 2 (taquizoítos), respectivamente, porém, sem soronegativar até o final do experimento.

Esta precocidade na resposta humoral em infecções experimentais de *T. gondii*, foi também detectada por MOURA et al. (2007) em suínos, ARANTES et al. (2009) em cães, LOPES et al. (2009a) em ovinos, e por SCARPELLI et al. (2009) em bovinos.

A avaliação espermática, ou espermograma, largamente utilizada no manejo reprodutivo de diversas espécies animais, vêm sendo considerada de extrema importância para o monitoramento de ovinos reprodutores. Frequentemente realiza-se tal avaliação, como exame de rotina em animais selecionados para acasalamento, ou como meio de diagnóstico de alterações da esfera reprodutiva (VANNUCHI et al., 1998).

No presente estudo, para os animais inoculados com oocistos, observou-se uma diminuição da motilidade espermática (<70%) nos 5^o, 7^o, 11^o, 42^o, 49^o e 70^o DPI. De forma semelhante, o mesmo ocorreu com o sêmen do ovino inoculado com taquizoítos nos dias 7, 11, 42, 63 e 70 pós-inoculação. Salienta-se, entretanto, que o mesmo ocorreu no 35^o, 42^o, 56^o e 70^o DPI no sêmen do ovino pertencente ao grupo controle. PRIETO et al. (1996) e OWSIANNY et al. (1998) afirmaram, ainda, que os parâmetros seminais e a morfologia espermática podem ser influenciados por diversos fatores, tais como: causas infecciosas (ex.: vírus da síndrome respiratória), condições climáticas e até mesmo por características fenotípicas como tamanho/volume testicular.

Outro fator que também pode ter contribuído para diminuição do volume e da motilidade, pode ter sido as elevadas temperaturas constatadas ao longo do experimento, à semelhança do ocorrido em outros estudos, em suínos (MOURA et al., 2004) e ovinos (LOPES et al., 2009b). Em contraste, TERPSIDIS et al. (2009) inocularam *T. gondii* (cepa GT F1) em ratos e observaram alterações, em alguns parâmetros, espermáticos principalmente na motilidade e concentração do sêmen destes animais experimentalmente infectados.

As alterações anatomohistopatológicas, observadas nos ovinos deste experimento (infiltrado inflamatório focal mononuclear intersticial em próstata e em vesícula seminal), não podem seguramente ser atribuídas ao *T. gondii*, em face da não observação do parasito nos cortes histológicos efetuados. Por outro lado, inexistência de alterações nos tecidos do reprodutor pertencente ao grupo controle, não nos permite descartar estes achados. Outro aspecto a ser considerado, são os tecidos dos machos analisados no presente estudo (testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata), uma vez que, nenhuma referência sobre a utilização destes tecidos em ovinos foi detectada na literatura, o que dificulta uma discussão mais profunda. ESTEBAN-REDONDO et al. (1999); DA SILVA & LANGONI (2001) ressaltaram da dificuldade em se isolar este agente por meio desta técnica.

A primeira notificação de isolamento de *T. gondii* em amostras seminais de ovinos, encontrada na literatura, pertence a SPENCE et al. (1978). DISKO et al. (1971) tiveram sucesso na tentativa de recuperação deste agente em amostras seminais de três de 125 homens com infecção toxoplásmica natural. SPENCE et al (1978), TEALE et al. (1982), AGANGA et al. (1988) e LOPES (2007) pesquisando amostras seminais de ovinos, DUBEY & SHARMA (1980) e SANTANA (2007) em caprinos, MOURA et al. (2007) em suínos, ARANTES et al. (2009) em caninos, e SCARPELLI et al. (2009) em bovinos, obtiveram resultados positivos, pela bioprova detectando *T. gondii* nos ejaculados colhidos de animais experimentalmente infectados.

Ainda em ovinos, TEALE et al. (1982) inocularam seis animais com 2000 cistos cada (cepa não mencionada), pela via subcutânea. A presença de *T. gondii* nas amostras seminais dos carneiros foi observada em três dos seis animais inoculados, em duas ocasiões para cada um dos ovinos (16° e 26° DPI). Também em ovinos, AGANGA et al. (1988), na Nigéria, num trabalho envolvendo inoculação de reprodutores ovinos (cepa TS-1), puderam recuperar *T. gondii* em amostras seminais colhidas no 21° DPI de todos os machos infectados.

No presente trabalho, pela bioprova isolou-se *T. gondii* em ejaculados do ovino inoculado com oocistos no 35°, 42°, 63° e 70 DPI. No reprodutor que recebeu taquizoítos, a presença do parasito também foi detectada no 11°, 49°, 56 ° e 70° DPI. Utilizando a técnica da PCR, para amostras seminais positivas na bioprova, detectou-se o DNA de *T. gondii* no sêmen do ovino inoculado com oocistos no 42° DPI, e no 70° DPI para o ovino infectado com taquizoítos. Resultados semelhantes foram encontrados em ovinos por LOPES et al. (2009a).

É importante ressaltar que, além dos reprodutores (inoculados) produzirem anticorpos contra-*T. gondii*, e amostras seminais mostraram-se positivas para *T. gondii* (bioprova e PCR), foi possível, ainda, isolar este coccídio por meio da bioprova no “pool” de tecidos (testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata) de ambos reprodutores experimentalmente infectados e pela técnica de PCR, no “pool” de tecidos do ovino infectado com taquizoítos.

JACOBS & MOYLE, (1963) isolaram *T. gondii* de 67% dos ovinos sorologicamente positivos, sendo que o diafragma foi o tecido mais parasitado, seguido pela musculatura esquelética e cérebro. WORK (1967) na Dinamarca realizou tentativas de isolamento de *T. gondii* em diafragma de 30 ovinos, dos quais sete se mostraram positivos. HARTLEY & MOYLE (1974) isolaram *T. gondii* em 14 de 15 cordeiros com infecção congênita. Neste caso, cérebro e musculatura esquelética apresentaram-se positivos para este parasito. Em oito ovinos inoculados com 10.000 oocistos da cepa GT-1, eutanasiados no 97 ° e 173° DPI, DUBEY (1984) verificou a presença de *T. gondii* no coração de sete destes animais, diafragma, fígado e musculatura esquelética em seis ovinos e quatro animais apresentaram o cérebro parasitado por este protozoário.

6.3. Discussão - Fêmeas e Filhotes

Concomitantemente as colheitas de sêmen dos reprodutores, do presente trabalho, avaliou-se a possibilidade destes machos, portadores de infecção toxoplásmica aguda, transmitirem via sêmen (monta natural) o *T. gondii* para ovelhas reprodutoras soronegativas.

Após a monta natural, duas e três fêmeas montadas naturalmente pelo reprodutor inoculado com oocistos e taquizoítos, respectivamente, soroconverteram. Mesmo portadoras de infecção toxoplásmica, não se observou, nas cinco fêmeas positivas, sinais clínicos relevantes que pudessem ser atribuídos ao *T. gondii*. Convém salientar que as outras três fêmeas expostas à monta natural pelo ovino do G1 (infectado com oocistos), duas pelo macho do G2 (inoculado com taquizoítos) e as duas fêmeas montadas naturalmente pelo reprodutor pertencente ao grupo controle (G 3), não apresentaram durante todo o experimento, anticorpos específicos para *T. gondii*.

A não observância de sinais clínicos decorrentes da infecção toxoplásmica nas ovelhas reprodutoras deste estudo pode ser consequência do tamanho dos animais utilizados (ovelhas com peso médio de 45 kg) e da resistência natural das fêmeas, uma vez que todas estavam em idade reprodutiva e *T.gondii* é sabidamente mais patogênico em animais jovens (DUBEY, 1985). De acordo com OWEN et al. (1998), ovelhas gestantes experimentalmente infectadas por *T. gondii*, podem manifestar sinais de abortamento, reabsorção fetal, nascimento de cordeiros fracos e prematuros, além de pirexia e aumento da frequência respiratória. Já nas infecções naturais, o que é o caso das cinco reprodutoras positivas do presente estudo, as ovelhas geralmente não apresentam nenhum sinal clínico sistêmico (DUBEY & KIRKBRIDE, 1984). Outro aspecto a ser considerado, é a via de transmissão deste agente (via sêmen após a monta natural) diagnosticada no presente trabalho, uma vez que, nenhuma referência sobre esta via de infecção-transmissão na espécie ovina está descrita na literatura.

Foi possível observar um aumento nos valores de referência dos parâmetros clínicos (temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória) das 15 ovelhas, dos três grupos experimentais. Entretanto, tais valores ocorreram tanto nas fêmeas que apresentaram anticorpos específicos para *T. gondii*, quanto nas reprodutoras que não soroconverteram durante todo o experimento. Convém salientar que, tais alterações ocorreram, em todas as fêmeas, principalmente, no terço final de gestação. Tal fato pode estar relacionado com a diminuição de espaço da cavidade abdominal, devido à presença dos fetos, refletindo, assim, diretamente no aumento dos parâmetros clínicos das reprodutoras (SMITH, 1993).

A infecção toxoplásmica das cinco ovelhas, via sêmen após a monta natural pelos machos experimentalmente infectados com *T. gondii*, desencadeou uma resposta imunológica rápida, com detecção de anticorpos a partir do 3º ou 5º DPMN. É importante lembrar que, as ovelhas foram monitoradas quanto à presença de anticorpos específicos contra *T. gondii*, desde o 30º dia que antecedeu a monta natural das mesmas, por ovinos machos não infectado (controle), ou inoculados pelo protozoário em questão. Título sorológico máximo de 4096 foram diagnosticados nas ovelhas infectadas, após monta natural, pelo macho inoculado com oocistos e pelo reprodutor infectado com taquizoítos. Embora tenham ocorrido alterações nos títulos de anticorpos no decorrer do experimento para estas cinco fêmeas, decréscimos acentuados destes títulos foram observados a partir do 105º e 112º DPMN para as duas ovelhas do grupo 1 (oocistos) e a partir do 126º DPMN para ovelhas submetidas à monta natural pelo macho reprodutor inoculado com taquizoítos (G2) de *T. gondii*. Convém salientar que apesar de ter ocorrido decréscimo nos títulos sorológicos destas ovelhas, as mesmas continuaram apresentando, até o parto, anticorpos específicos anti-*T. gondii*.

Estes achados harmonizam-se com os relatados por SHARMA & SHIMIZU (1974), citados por DUBEY (1986). Estes autores relataram que anticorpos relacionados à infecção crônica (IgG) apresentam a capacidade de manterem “ativos” por longo período, quando comparados com as imunoglobulinas da classe IgM, notadamente identificadas apenas nas primeiras semanas após infecção.

A detecção do *T. gondii* na corrente sanguínea das ovelhas ocorreu nas cinco ovelhas naturalmente infectadas via sêmen. Dos 14 picos de parasitemia detectados, quatro foram entre o 7º e 28º DPMN, seis entre o 56º e 84º DPMN e outros quatro entre o 98º e 133º DPMN. Resultados semelhantes foram observados em ovinos machos inoculados com oocistos (cepa GT-1) por DUBEY & SHARMA (1980). Estes autores detectaram parasitemia nos sete ovinos no 6º e 11º DPI. TEALE et al (1982) de oito ovinos inoculados, recuperaram *T. gondii* (parasitemia) somente em dois, sendo um no 21º e outro no 26º DPI.

Ovelhas inseminadas (corno uterino), por laparoscopia, com sêmen fresco artificialmente contaminado com taquizoítos (cepa CPG), apresentaram anticorpos contra *T. gondii* no 7º dia pós-inseminação artificial (MORAES et al., 2010). Entretanto, nenhum resultado necroscópico comprobatório de infecção toxoplásmica foi citado por estes autores.

De todas as ovelhas naturalmente infectadas por *T. gondii* via sêmen, apenas a quarta fêmea (238), exposta à monta natural pelo macho 1234 (inoculado com taquizoítos), apresentou feto macerado no 65º DPMN. É importante relatar que, nesta mesma ovelha, foi

possível, ainda, detectar a presença de *T. gondii* (parasitemia) alguns dias que antecederam a necropsia. Utilizando-se a técnica histopatológica, o bioensaio e a PCR após a necropsia, verificou-se ainda que, esta ovelha continha o protozoário em questão. Nas demais fêmeas, inclusive nas do grupo controle, e em seus respectivos filhotes, não foram observadas alterações reprodutivas.

VAUGHAN et al. (1996) relataram que, problemas reprodutivos, originários pelo *T. gondii*, como reabsorção fetal, abortamento, ou natimortalidade, ocorreriam quando há primoinfecção durante a gestação, e a gravidade pode variar de acordo com o estágio da mesma e a cepa de *T. gondii* envolvida. Estes autores afirmaram, ainda, que, se a infecção pelo protozoário supracitado acontecer até o septuagésimo dia de gestação, poderá ocorrer à reabsorção fetal ou abortamento. Segundo os autores, quanto mais tarde se der a infecção, maior será a capacidade de o feto nascer viável e sobreviver, podendo estar infectado ou não.

Os resultados encontrados nas análises histopatológicas do presente estudo (endometrite, pneumonia, ente outros), estão de acordo com os observados, em cadelas reinfectadas com oocistos e taquizoítos de *T. gondii*, por BRESCIANI et al. (2009).

Outro importante resultado encontrado neste trabalho, foi à positividade (RIFI – IgG) de cinco, dos oito, cordeiros, filhotes das ovelhas naturalmente infectadas por *T. gondii*, logo ao nascimento. Convém salientar que esta colheita de sangue foi realizada antes que os cordeiros ingerissem o colostro, evitando assim ingestão de possíveis anticorpos e taquizoítos presentes no leite das ovelhas. Tal fato comprova que o contato que estes animais tiveram com *T. gondii*, ocorreu durante a gestação.

WILLIAMS et al. (2005) em um estudo que se baseou exclusivamente em resultados de PCR, relataram que, juntamente com um elevado número de abortamento, uma maior frequência de transmissão vertical (41 a 69%) deste coccídio ocorreu em cordeiros recém-nascidos. BUXTON et al. (2006) e SILVA & RUE (2006) relataram que a transmissão vertical da toxoplasmose, em ovelhas persistentemente positivas, apesar de ser pequena, não deve ser descartada. FREYRE et al. (2009) avaliando um modelo experimental de transmissão congênita em hamster, puderam constatar que esta via de transmissão aconteceu em 13 dos 17, hamster infectados com oocistos ou bradizoítos de *T. gondii*.

Por meio da bioprova, isolou-se *T. gondii*, (presença de diversos cistos cerebrais contendo bradizoítos), do “pool” de tecidos tanto em camundongos inoculados com tecidos das cinco ovelhas naturalmente infectadas, quanto em camundongos inoculados com “pool” de tecidos dos cinco filhotes, soropositivos, das respectivas fêmeas naturalmente infectadas

por *T. gondii*. Tal fato evidencia que, durante a gestação houve a passagem de taquizoítos, do coccídio em questão, pela placenta de algumas fêmeas sexualmente infectadas. Os resultados encontrados por SHARMA & GAUTAN (1974); DUBEY & SHARMA (1980) e DUBEY (1984) corroboram com os encontrados no presente trabalho. Os autores anteriormente citados isolaram, pela bioprova, *T. gondii* de órgãos de ovinos após 173 dias de inoculação com oocistos e taquizoítos do respectivo protozoário.

Utilizando-se da técnica da PCR, no presente trabalho, foi possível detectar o DNA do *T. gondii* no “pool” de tecidos da segunda fêmea (5) coberta pelo macho 1224 (inoculado com oocistos) e também no “pool” de tecidos dos dois filhotes oriundos da quinta fêmea (184) submetida à monta natural pelo mesmo reprodutor. No grupo das ovelhas expostas à monta natural pelo macho 1234 (infectado com taquizoítos), foi possível visualizar a amplificação do DNA de 194 pares de base deste coccídio na quarta (238) e quinta (161) fêmeas montadas naturalmente pelo ovino supracitado. Neste trabalho, um segmento de 194 bps do gene B₁ de *T. gondii* foi amplificado, uma vez que este gene está presente em pelo menos 35 lócus do genoma de *T. gondii* e por ser amplamente conservado nos várias cepas analisadas (BURG et al., 1989 e FUENTES et al., 1996).

A ausência de positividade de parasitismo, detectada pela PCR, de algumas amostras genômicas seminais e do “pool” tecidual dos ovinos (machos, fêmeas e filhotes) infectados, não descarta a possibilidade do *T. gondii* estar presente nas mesmas, uma vez que parte destes possa ter sido perdido com a técnica de extração de DNA, além de que, 500ng de DNA “genômico” (hospedeiro+parasito) por reação, pode conter uma baixa quantidade de DNA do parasito, que pode ser insuficiente para visualizar a amplificação de 194 bps no gel de eletroforese 2% corado com brometo de etídeo (DUBEY & THULLIEZ, 1993; ESTEBANREDONDO et al., 1999 e AQUIZERATE et al 1993). Alguns autores afirmam que a técnica da PCR pode ser um método vantajoso, quando associado a outro meio de diagnóstico (STEUBER et al., 1995 e ELLIS 1998). Deste modo, os achados da PCR apenas reforçam os achados da bioprova e evidenciam que esta técnica pode ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da infecção toxoplásmica. Reforça esta inferência, os resultados obtidos por DA SILVA & LANGONI (2001), quando estes autores compararam, em ratos, a citologia, histologia, bioensaio e PCR, como meio de diagnóstico para *T. gondii*, concluindo que o bioensaio é significativamente superior as demais técnicas de diagnóstico. Estudando o abortamento ovino associado ao *Toxoplasma gondii* na Espanha, por diferentes técnicas de diagnóstico (histopatológico, RIFI, ELISA e PCR), PEREIRA-BUENO et al. (2004)

constatarem que a Reação de Imunofluorescência e ELISA foram os métodos mais sensíveis para detectar este coccídio, seguido do exame histológico e PCR, respectivamente.

Superioridade do boiensaio em comparação à técnica de PCR, também foi diagnosticado em sêmen e/ou tecidos de suínos por GARCIA et al. (2006); TSUTSUI et al. (2007) e MOURA et al. (2007), em cães por ARANTES et al. (2009), em ovinos por LOPES et al. (2009a), em gatos por MONTOYA et al. (2009) e em bovinos por SCARPELLI et al. (2009).

Deste modo, pelos resultados obtidos, comprova-se a transmissão sexual de *Toxoplasma gondii* na espécie ovina por meio da monta natural, com conseqüente transmissão vertical nos cordeiros, fato inédito na literatura.

7. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, por meio do delineamento experimental utilizado, as seguintes inferências puderam ser extraídas.

a) *Toxoplasma gondii* pôde ser isolado no sêmen, pela bioprova e pela PCR, dos reprodutores portadores de infecção toxoplásmica, em datas em que os mesmos realizaram a monta natural nas fêmeas selecionadas.

b) Ovelhas isentas de infecção toxoplásmica apresentaram anticorpos específicos contra-*T. gondii*, após terem sido submetidas à monta natural por machos experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*

c) Parasitismo tissular por *Toxoplasma gondii* pôde ser diagnosticado nas fêmeas, por quatro importantes métodos laboratoriais (RIFI, histopatologia, bioensaio e PCR)

d) A transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* nos cordeiros (oriunda da transmissão sexual) pôde ser confirmada por meio da RIFI, bioprova e pela Reação em Cadeia em Polimerase (PCR).

e) O diagnóstico de *Toxoplasma gondii* no sêmen dos ovinos infectados, a soroconversão (RIFI) e posterior isolamento deste coccídio (bioprova e PCR) nas ovelhas, e em seus respectivos cordeiros, comprovam que a infecção toxoplásmica pode ser transmitida sexualmente na espécie ovina.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N., SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Washington D.C.: Organizacion Panamericana De La Salude, 1986. Publicación Científica n° 503.

AGANGA, A.O.; UMOH, J.U.; KYEWALABYE, E.K.; EKWEMPU, C.C. Comparative experimental transmission studies with Nigerian isolates and TS-I strain of *Toxoplasma gondii* in sheep. *J. An. Prod. Res.*, v.08, n. 02, p. 104-120, 1988.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: *Institut National de la Recherche Agronomique*, 190p, 1988.

AMARAL, V.; SANTOS, S.M.; REBOUÇAS, M.M. Sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de caprinos e ovinos procedentes, respectivamente, dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, Brasil. *O Biológico*. 12, 331-40, 1978.

AQUIZERATE, F.; CAZENAVE, J.; POIRIER, L.; VERIN, P.H.; CHEYROU, A.; BEGUERET, J.; LAGOUTTE, F. Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humour by the polymerase chain reaction. *Brit. Journ. Ophthamol*. 77: 107-09, 1993.

ARANTES, T.P. Transmissão sexual do *Toxoplasma gondii* em cães (*Canis familiares*). Jaboticabal, FCAVJ – Universidade Estadual Paulista, 2005. 83p. (Dissertação de Mestrado).

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M.; PIERONI, J.P.; PINTO, V.; SAKAMOTO, C.A.M.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. *Experimental Parasitology*. v. 123, p.190-194, 2009.

ARIAS, M.A.; CHINCHILLA, M.; REYES, L.; LINDER, E. Seroepidemiology of Toxoplasmosis in humans possible transmission routes in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* v. 44, p. 377-381, 1996.

BACHMEYER, C.; MOUCHNINO, G.; THULLIEZ, P.; BLUM, L. Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. *J. Infec.* v. 52, n. 2, p. e55 –e57, 2006.

BEVERLEY J.K.A.; WASTON W.A. Ovine abortion and toxoplasmosis in Yorkshire. *Vet Res.* v. 73, p. 6-11, 1961.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterin.*, v. 25, p. 383-391, 1973.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K.; MACEDO, Z.S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. *Journal of Tropical Pediatrics.* v. 43, n. 02, p. 116, 1997. Research letter.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA; J CENEPI. Boletim Epidemiológico. Brasília, Centro Nacional de Epidemiologia, v. 08, n. 31, 1996.

BRESCIANI, K. D. S, Reinoculação de *Toxoplasma gondii* em cadelas gestantes portadoras de infecção toxoplásmica natural. Jaboticabal, 2003. 109p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista (UNESP) câmpus de Jaboticabal.

BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; TONIOLLO, G.; LUVIZOTTO, M.C.R.; KANAMURA, C.; MORAES, F.R.; PERRI, S.H.V.; GENNARI, S.M. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. *Parasitology Research.* V. 104, p. 1213-1217, 2009.

BUENO, P.J.; GOZALO, Q.A.; PÉREZ, P.V.; GARCIA, A.G.; FERNANDEZ, C.E.; MORA, O.L.M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain different diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* v. 121, p. 33-43, 2004.

BURG, J.L.; GROVER, C.M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii* by Polymerase Chain Reaction. *Joun. Clin. Microbiol.* v.27: 1787-92, 1989.

BUXTON, D.; McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitol.* v.18, p. 546-552, 2002.

BUXTON, D.; RODGE, S.M.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.E. Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. *Small Ruminant Research*. v. 62, p. 43-6, 2006.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop.* v. 06, n. 03, p.117-118, 1964.

CAVALCANTE, G.T., AGUIAR, D.M., CHIEBAO, D.P., MEIRELES, L.R., ANDRADE, H.F., CAMARGO, L.M.A., LABRUNA, M.B., RUIZ, V.L.A., GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em humanos e animais domésticos da zona Monte Negro, Rondônia. Thirteenth Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ouro Preto, Minas Gerais, vol. 13 (Suplemento), Brasil, 20-24 de setembro de 2006, *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.* 217, 2004.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Manual para o diagnóstico de laboratório de la leptospirosis. Buenos Aires: 1985. 46p. (Norma Técnica 30).

CHIARI, C.A.& NEVES, D.P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 79, n. 03, p. 337-340, 1984.

CLEMENTINO, M.M., SOUZA, M.F., ANDRADE NETO, V.F., 2007. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes. Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 146, 199–2003.

COLLAZOS, J. Opportunistic infectious of the CNS in patients with AIDS: diagnosis and management. *CNS Drugs*. v. 17, n. 12, p. 869-887, 2003.

CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J.P; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostics Investigations*, v.5p. 572-578, 1993.

COOK, A.J., PASSOS, A.L., GUERVEZ, A.M. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *Brit. Med. J.* v. 321, p.142-147, 2000.

COSTA, A.J., ARAÚJO, F. G., COSTA, J. O., LIMA, J. D., NASCIMENTO, E. Experimentalinfection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. *J.Parasitol.* v.63, n.2, p.212-8, 1977.

COSTA, A.J.; KASAI, N.; PAULILO, A.C.; SILVA, M.B.; GALESCO, H. Anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de bovinos do município de Jaboticabal,SP, Brasil. *Arq. Instit. Biológico.* v. 45, p. 299-302, 1978.

COLE, C.R.; SANGER, V.L.; FARREL, R.L.; KORNDER, J.D. The present status of toxoplasmosis in veterinary medicine. *North. An. Veterinarian.* 35: 265-70, 1954.

CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; SANTORO, F. Restrictionfragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitology Research.* v. 77, n. 2, p. 266-268, 1991.

DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Parasitology.* v.97, n.3, p.191-198, 2001.

DARDÉ, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali Dell'Instituto Superiore di Sanità.* v. 40, n. 1, p. 57-63, 2004.

DUBEY, J.P. Feline toxoplasmosis and its methods transmission. *Veterinary Bull.* v. 38, p. 495-499, 1968

DUBEY,J.P. Toxoplasmosis in dogs . *Canine Pract.*, v.28,p.7-28, 1985.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidian of man and animals. In: Gregarines, haemogregarines, coccidian, plasmodia and haemoproteids. *London Academic Press.* v. 3, p. 102-219, 1977.

DUBEY, J.P. Experimental toxoplasmosis in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int. Goat. and Sheep. Res.* 2: 93-104, 1984.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 189, p.166-170, 1986.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. *Journal Am. Vet. Med. Assoc.* v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1990.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis and Other Coccidial infections. In: SHERDING, R. G. (ed.) *The Cat: Diseases and Clinical Management*. 2 ED. New York, 1994a. P. 565-584.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 205, p. 410-415, 1994b.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *Journal of Parasitology*. v. 81, n. 3, p. 410-415, 1995.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet. Parasitol.* v. 64, p. 65-70, 1996.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. *Veterinary Pathology*. v. 11, p. 350-379, 1974.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 66: 111-19, 1980.

DUBEY, J.P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. Journal Vet. Res.*, v. 54, n. 2, p. 270-273, 1993.

DUBEY, J. P.; SWAN, G. V.; FRENKEL, J. K. A. Simplified method for isolation of *T.gondii* from the feces of cats. *J. Parasitol.*, v. 58, n. 05, p. 1055-1056, 1972.

DUBEY, J. P.; SUNDBERG, J. P.; MATIUCK, S. W. Toxoplasmosis associated with abortion in goats and sheep in Connecticut. *American Journal Veterinary Research*. v.42, n.9, p.1624-1626, 1981.

DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. Epizootics of ovine abortion due to *Toxoplasma gondii* in North central United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 184, n. 6, p. 657-660, 1984.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 220p, 1988.

DUBEY, J. P.; SONN, R. J.; HEDSTROM, O.; SNYDER, S. P.; LASSEN, E. D. Serologic and histologic diagnosis of ássaros ica abortions in sheep in Oregon. *Journal of Amedrican Veterinary Medical Association*. v. 196, n.2, p.291-294, 1990.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitol*. 74, 75-7, 1998.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* v.11, p. 67-69, 1998.

DUBEY, J.P., HAMIR, A.N. Experimental toxoplasmosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J. Parasitol.* v.88, p.514-9, 2002.

ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Intern. J. Parasitol.* 28: 1053-60, 1998.

ENGELAND, I. V.; WALDELAND, H.; KINDAHL, H.; ROPSTAD, E.; ANDRESEN, O. Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the development of pregnancy and on endocrine foetal-placental function in the goat. *Veterinary Parasitology*. v. 67, p. 61-74, 1996.

ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comparative Immunology Microbiology Infectious Disease*, v.20, p.191-196, 1997.

ESTEBAN REDONDO; MALEY, S.W.; THOMSON, K.; NICOLI, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet. Parasitol.*86: 155-71, 1999.

FAYER, R. Toxoplasmosis update and public health implications. *Can. Vet. J.* v. 22, p.344-352, 1981.

FIGLIUOLO, L. P. C., KASAI N., RAGOZO A. M. A., PAULA V.S.O., DIAS R.A., SOUZA S.L.P., GENNARI S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology.* v. 123, p161-166, 2004.

FIGUEROA DAMIAN, R. Risk of transmission of infectious diseases by transfusion. *Ginecol Obstet Mex.*, v. 66, p. 277-283, 1998.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Sciences.* v. 167, p. 893-896, 1970.

FRENKEL, J.K.; HASSANEIN, K.M.; HASSANEIN, R.S.; BROWN, E.; THULLIEZ, P.; QUITERONUNEZ, R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama-City. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.53, p. 458-468, 1995.

FRENKEL, J.K.; PARKER, B.B. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of Xenosmophilia. *Ann. N. Y. Sci.* v. 791, p. 402-407, 1996.

FREYRE, A., BONINO, J.; FÁLCÓN, J.; CASTELLS, D.; CORREA, O.; CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary Parasitology.* v.73, p.13-15, 1997.

FREYRE, A.; FIALHO, C.G.; BIGATTI, L.E.; ARAUJO, F.A.P.; FALCÓN, J.D.; MENDEZ, J.; GONZÁLEZ, M. *Toxoplasma gondii*: Congenital transmission in a hamster model. *Experimental Parasitology.* v. 122, p. 140-144, 2009.

FUENTES, S.I.; RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C.J.; FERNANDO, C.C.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *Journal Clin. Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 2368-2372, 1996.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do Norte do Paraná-Brasil. *Ciência Rural*. v. 29, n.1, p.91-97, 1999.

GARCIA, J.L.; GENNARI, S.M.; MACHADO, R.Z.; NAVARRO, I.T. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology*. v. 113, p. 267-271, 2006.

GENNARI, S.M.; CANON-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 121, p. 337-340, 2004.

GHARHAN, H.S.; LIAISON, R. Sheep as a potential reservoir of *Toxoplasma* for man. *Lancet*. 9: 71-4, 1960.

GIRALDI, N., VIDOTTO, O., NAVARRO, I.T., GARCIA, J.L., OGAWA, L., KOPYKA, E. *Toxoplasma* antibody and stool parasites in public school children, Rolândia, Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.35, 215-219, 2001.

GLASNER, P.D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MERTINS, M.C.; BURNER, M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M.E.; NUSSENBLAT, R.B.; KASLOW, R.A.; BELFORT, R. An Unusually High prevalence of Ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* v. 114, p. 136-144, 1992.

HALONEN, S.K., TAYLOR, G.A., WEISS, L.M. Gamma interferon- induced anhibition of *Toxoplasma gondii* in astrcytes is mediated by IGIP . *Infect. Immunol.*, v. 69, p. 5573-6, 2001.

HARTLEY, W.J.; MIOLE, G.G. Further observations on the epidemiology of ovine *Toxoplasma* infection. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 52: 647-53, 1974.

HARTLEY, W.J.; MUNDAY, B.L. Felidae in the dissemination of toxoplasmosis to man and other animals. *Australian Veterinary Journal*. v. 50, p. 224-228, 1974.

HESSLER, J.R.; WOODARD, J.C.; TUCEK, .C. Lethal toxoplasmosis in o Woolly Monkey. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 159, p. 1588-1594, 1971.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; BRAEKELLER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and is its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30: 69-75, 2000.

HUNG, C.C.; FAN, C.K.; SU, K.E.; SUNG, F.C.; CHIOU, H.Y.; GIL, V.; FERREIRA, M.D.A. C.; CARVALHO, J.M.; CRUZ, C.; LIN, Y.K.; TSENG, L. F.; SAO, K.Y.; CHANG, W. C.; LAN; H.S.; CHOU, S.H. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. *Trans. Royal Soc. Trop. Med.* v. 101, p. 134-139, 2007.

JACOBS L., MOYLE G.G. The prevalence of toxoplasmosis in New Zealand sheep and cattle. *Am. J. Vet. Res.* v.24, p.673-77, 1963.

JAMRA, L.M.F., VIEIRA, M.P.L.. Isolamento do *Toxopalsma gondii* de exudato peritoneal e órgãos de camundongos com infecção experimental. *Rev. Inst. Med. Trop.* v. 33, p. 435-441, 1991.

KANETO, C.N.; COSTA, A. J.; PAULILLO, A.C.; MORAES, F.R et al. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitology.* v. 69, n. 3-4, p. 203-210, 1997.

KHETSURIANI, N., HOLAMAN, R.C., ANDERSON, L.J. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988-1997. *Clin. Infect. Dis.* v.35, n.2, p. 175-82, 2002.

KRAVETZ, J.D.; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. *The Am. J. Med.* v. 118, n. 3, p. 212-216, 2005.

LANGONI, H. et al. Inquérito soropidemiológico para a toxoplasmose em ovinos no Estado de São Paulo, Brasil. *O Biológico.* São Paulo, v.61, n.1, p.35-39, 1999.

LARSSON, C.E.; JAMRA, L.M.F.; GUIMARÃES, E.C. Prevalência da toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. v.14, p.582-588, 1980.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocist. *Compedium on Continuing Education for the Practicing Veterinary*. v. 19, n. 4, p. 448-461, 1997.

LIU, Q.; NEI, F.; GAO, S.; JIANG, L.; LAIN, H.; YUAN, B.; XIA, Z.; LIU, B.; XU, X.; ZHU, X. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 103, p. 162-166, 2009.

LOPES, W.D.Z. Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (*Ovis aries*) machos experimentalmente infectados. Jaboticabal, FCAVJ – Universidade Estadual Paulista, 2007. 113p. (Dissertação de Mestrado).

LOPES, W.D.Z., COSTA, A.J., SANTANA, L.F., SANTOS, R.S., ROSSANESSE, W.M., LOPES, W.C.Z., COSTA, G.H.N., SAKAMOTO, C.A., SANTOS, T.R. Aspects of *Toxoplasma* Infection on the Reproductive System of Experimentally Infected Rams (*Ovis aries*). *J. Parasitology Research*. p. 1-6, 2009a.

LOPES, W.D.Z.; COSTA, A.J.; SOUZA, F.A.; RODRIGUES, J.D.F.; COSTA, G.H.N.; SOARES, V.E.; SILVA, G.S. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *An. Reprod. Sci.* v. 111, p. 312-319, 2009b.

LOPES, W.D.Z., SANTOS, T.R., SANTOS, R.S., ROSSANESE, W.M., SOUZA, F.A.; RODRIGUES, J.D.F.; MENDONÇA, R.P.; SOARES, V.E.; COSTA, A.J. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. *Res. Vet. Sci.* v.88, p.104-106, 2010.

LUFT, R. Z.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis. *J. Infec. Dis.* v. 157, p. 01-06, 1988.

MAIA, M.S. *Manual de Inseminação artificial em Caprinos e Ovinos*. Sebrae/RN. 1998. 49p.

MAMID, A.; SIMONE, J. A.; POMERANTZ, R. J. Central nervous system infectious in individuals with HIV-1 infectious. *J. Neurovirol.* v. 8, p. 158-167, 2002.

MARONPOT, R.R.; BOTROS, B.A.M. *Toxoplasma* serologic survey in man and domestic animals in Egypt. *J. Egypt Publ. Hlth.* v. 47, p. 58-67, 1972.

MEIRELES, L., GALISTEO JR. A. J., ANDRADE JR. H. F. Pesquisa sorológica de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de produção do Estado de São Paulo, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.40, p.267-271, 2003.

MIES FILHO, A. et al. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 1992.

MIGLIANO, L. Um caso de toxoplasmose canica. *Brasil Médico.* V. 26, p. 273-274, 1912.

MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMIREZ, C.; FUENTS, I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.* v. 160, p. 159-162, 2009.

MORAES, E.P.B.X.; BATISTA, A.M.; FARIA, E.B.; FREIRE, R.L.; FREITAS, A.C.; SILVA, M.A.R.; BRAGA, V.A.; MOTA, R.A. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Vet. Parasitol.* In press. (2010), doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.017.

MORLEY, E. K.; WILLIAMS, R. H.; HUGHES, J. M.; TERRY, R. S.; DUNCANSON, P.; HIDE, G. Significant familial differences in the frequency of abortion and *Toxoplasma gondii* infection within a flock of Charollais sheep. *Parasitology.* v. 131, p. 181-185, 2005.

MOURA, A. B. *Toxoplasma gondii*: avaliação da infecção experimental em suínos (*Sus scrofa*) machos, com ênfase no sistema reprodutor. Jaboticabal, FCAVJ – Universidade Estadual Paulista, 2004. 104p. (Tese de Doutorado).

- MOURA, A. B., COSTA, A.J.; FILHO, J. S.; PAIM, B. B.; PINTO, F. R.; DI MAURO, D.C. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. *Pesq. Vet. Bras.* 2007; 27: 430-434, 2007.
- MUNIR, A.; ZAMAN, M.; ELTORKY, M. *Toxoplasma gondii* pneumonia in a pancreas transplant patient. *South Med. Journal.* v. 93, p. 614-617, 2000.
- NAVARRO, I.T.; GIRALDI, N.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J.L Entero parasite prevalence among daycare and elementary school children of municipal school, Rolândia-PR, Brazil. *Ver. Bras. Societ. Med. Trop. Uberlândia.* v. 34, p. 26-28, 2001.
- NETO, V.A.; MEDEIROS, E.A.S.; LEVI, G.C.; DUARTE, M.I.S. *Toxoplasmoses*, São Paulo, Sarvier, 1995. 154p.
- NETO, J.O.A., AZEVEDO, S.S., GENNARI, S.M., FUNADA, M.R., PENA, H.F.J., ARAÚJO, A.R.C.P., BATISTA, C.S.A., SILVA, M.L.C.R., GOMES, A.A.B., PIATTI, R.M., ALVES, C.J. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Serid'ó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. *Veterinary Parasitology.* v. 159, p. 329-332, 2008.
- NEVES, J.G., FERRI, A.G., SALIBA, A.M. *Toxoplasmoses canina.* *Veterinário*, v.4, n.1, p.35-44, 1954.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L., Sur un protozoaire nouveau du *gondii*. *C.R. Acad. Sci.*, v. 148, p. 369, 1909.
- NISHIKAWA, H.; ARNONI, J.V.; RASSIER. D.S.S.; SILVA, S.S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic animals in Rio Grande do Sul State, Brazil. Resumos I Encontro de Pesquisas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 1984, 62p.
- OLAFSON, P. & MONLUX, W.S. *Toxoplasma* infection in animals. *Cornel. Vet.* 32, 316-6, 1942.

OLIVEIRA, F. C. R., COSTA, A.J.; SABATINI, G.A. Clínica e hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE). *Ciência Rural*. 31, n. 4, p. 621-626, 1997.

OWEN, M. R.; CLARKSON, M. J.; TREES, A. J. Acute phase *Toxoplasma* abortions in sheep. *Veterinary Record*. v. 142 p. 480-482, 1998.

OWSIANNY, J.; KAWÊCKA, M.; CZARNECKI, R.; RÓZYCKI, M. Relationship between the size of testes and the quantitative and qualitative parameters of the semen of Young boars. *Pig News and Information*, v. 19. n.02, p. 57N-60N, 1998.

PASSOS, L.N.; ARAÚJO FILHO, O.F.; ANDRADE JUNIOR, H.F. Toxoplasmosis encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev. Inst. Med. Trop.* v. 42, n. 3, p. 141-5, 2000

PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PÉREZ-PRÉREZ, G., ALVAREZ-GARCIA, G., COLLANTES-FRENANDEZ, E., ORTEGA-MORA, L.M. Evolution of ovine abortion assoated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* v. 121,p. 33 – 43, 2004.

PETRAK, M.; CARPENTER, J. Feline toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 146, p. 728-734, 1965.

PINHEIRO, J.W.; MOTA, R.A.; FONSECA, A.A.; FARIA, E.B.; GONDIM, L.F.P.; SILVA, A.V.; ANDERLINI, G.A. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. *Parasitol. Res.* v. 105, p. 709-715, 2009.

POTASMAN, I.; ARAUJO, F.G.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. *Toxoplasma gondii* antigens recognized by sequential sample of serum obtained from congenitally infants. *J. Clin. Microbiol.* v. 25, n. 10, p. 1926-1931, 1987.

PRADHAN, S.; YADAV, R.; MISHRA, V. N. *Toxoplasma* meningoencephalitis in HIV-seronegative patients: clinical patterns, imaging features and treatment outcome. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 101, p. 25-33, 2007.

PRIETO, C.; SUÁREZ, P.; BAUTISTA, J.M.; SÁNCHEZ, R.; RILLO, S.M.; SIMARRO, I.; SOLANA, A.; CASTRO, J.M. Semen changes in boars after experimental infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology*, v. 45, p. 383-395, 1996.

SANTANA, L.F. Toxoplasmose experimental em caprinos machos, com ênfase no sistema reprodutor. Jaboticabal, FCAVJ – Universidade Estadual Paulista, 2007. 87p. (Dissertação de Mestrado).

SAS, Institute, 2001. *SAS® User's Guide: Estatistics*. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.

SCARPELLI, L.C. Viabilidade da transmissão venérea do *Toxoplasma gondii* em bovinos. Jaboticabal, Dissertação de Mestrado- FCAVJ - Universidade Estadual Paulista, 128 p., 2001.

SCARPELLI, L.C., LOPES, W.D.Z., MIGANI, M., BRESCIANI, K. D. S., COSTA, A. J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. *Pesquisa Veterinária Brasileira* v. 29, p. 59-64, 2009.

SILVA, N.R.S. & COSTA, A.J. Frequência da toxoplasmose em ovinos dos municípios de Guaíba e São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Esc. Vet.* v. 3, p. 56-9, 1981.

SILVA, L. A., CUNHA, E. L. P., MEIRELES, L. R., GOTTSCHALK, MOTA, R. A., LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciencia Rural*. v.33 p. 115-119, 2003.

SILVA, K.L.M.; RUE, M.L. Possibilidade da transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município de Rosário do Sul, RS, Brasil. *Ciência Rural*. v. 36, p. 892-897, 2006.

SMITH, K.E.; ZIMMERMAN, J.J.; PATTON, S.; BERAN, G.W.; HILL, H.L. The epidemiology of toxoplasmosis on Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. *Vet. Parasitol.* v. 42, p.199-211, 1992.

SPENCE, J.B.; BEATTIE, J.; FAULKNER, L.; WATSON, W.A. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. *Veterinary Record*, v. 102, n. 02, p. 38-39, 1978.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala - azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev. Soc. Sci.*, v. 03, p. 109, 1908.

RUSSEL, E.L.; MCLEOD, R.; Roberts, C. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends in Parasitology.* v. 18, p. 198-201, 2002.

RHYAN, J. C.; DUBEY, J. P. Ovine abortion and neonatal death due to toxoplasmosis in Montana. *Journal of American Veterinary Association*, v. 184, p. 661-664, 1984.

SAAD, R.; VINCENT, J.F.; CIMON, B.; DE GENTILE, L.; FRANCOIS, S.; BOUACHOUR, G.; IFRAH, N. Pulmonary toxoplasmosis after allogeneic bone marrow transplantation: case report and review. *Bone Marrow Transplant*, v.18 p. 211-212, 1996.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Amer. Med. Assoc.* v. 116, p. 801-807, 1941.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, p.487-91, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Press. New York, Third edition. 2001.

SILVA, L.A., VIEIRA, R.S., SERAFINI, L.N., JUNIOR, C.G.C., FIGUEIREDO, J.F.C. Toxoplasmose do sistema nervoso central em pacientes sem evidência de imunossupressão: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v.34, 2001.

SHARMA, S.P.; GAUTAM, O.P. A note the prevalence of *Toxoplasma* antibodies among camels and pigs in Hissar. *Indian J. Anim. Sci.* 44, 214-8, 1974.

SMITH, B.P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. Editora Manole, São Paulo. V.1,2, 1993. 1738p.

SMITH, J. L. Documented outbreaks of toxoplasmosis: Transmission of *Toxoplasma gondii* to humans. *J. Food Protect.* v. 56, p. 630-639, 1993.

SOARES, H.S., AHID, S.M.M., BEZERRA, A.C.D.S., PENA, H.F.J., DIAS, R.A., GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. *Vet. Parasitol.* 160, 211–214, 2009.

STEUBER, V.; NIU, A.; BAUER, C.; REETZ, J.; ROTH, A.; JANITSCHKE, K. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of ovine abortions using polymerase chain reaction. *Dtsch. Tiera. Wschr.* 102: 91-4, 1995.

TEALE, A.J.; BLEWETT, D.A.; MILLER, J.K.; BUXTON, D. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of *Toxoplasma*. *The Veterinary Record*, v. 111, p. 53-55, 1982.

TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian. *Advances in Parasitology*. v. 39, p. 69-139, 1997.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, v. 30, p.1217-1258, 2000.

TERPSIDIS, K.I.; PAPAZHARIADOU, M.G.; TAITZOGLU, I.A.; PAPAIONNOU, N.G.; GEORGIADIS, M.P.; THEODORIDIS, I.T. *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in experimentally infected male rats. *Experimental parasitology*. v. 121, p.238-241, 2009.

TISUTSUI, V.S.; FREIRE, R.L.; GARCIA, J.C.; GENARI, S.M.; VIEIRA, D.P.; MARANA, E.R.M.; PRUDÊNCIO, L.B.; NAVARRO, I.T. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and

- mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootc.* v. 59, p.30-34, 2007.
- TODD, E. C. D. Preliminary estimates of costs in foodborne disease in the United States. *J. Food Protect.*, v. 52, p. 595-601, 1989.
- UENO, T.E.H., GONÇALVES, V.S.P., HEINEMANN, M.B., DILLI, T.L.B., AKIMOTO, B.M., de SOUZA, S.L.P., GENNARI, S.M., SOARES, R.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* v. 41, p. 547–552, 2009.
- VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E, C.; Avaliação seminal em cães – Aspectos práticos. *Clínica Veterinária*, Ano III, n.15, p.22-26, 1998.
- VAUGHAN, L. Abortion in sheep. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinary.* v.49, n.3, p.170-174, 1996.
- VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; MITSUKA, R.; GIRALDI, J. Avaliação de infectividade de oocistos de *Toxoplasma gondii*, cepa P, estocados em geladeira. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 2., 1986, Londrina. Anais... Londrina, 1986. p 20.
- VIDOTTO, O.; COSTA, A.J. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. In: Observações clínicas e hematológicas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v. 39, p. 623-639, 1987.
- YADAV, V.; CHU, NG K; RAIS, R.H.; AL SAFARJALANI, O.N.; GUARCELLO, V.; NAGUIB, F.N.M.; EL KOUNI, M.H. Synthesis, biological activity and molecular modeling of 6-benzylthioinosine analogues as subversive substrates of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase. *J. Med. Chemistry.* v. 47, n. 8, p. 1987-1996, 2004.
- YAP, G.S.; SHER, A. Cell-mediated Immunity to *Toxoplasma gondii*: Initiation, Regulation and Effector Function. *Immunobiology.* v. 201, p. 240-247, 1999.
- WILLIAMS, R.H., MORLEY, E.K., HUGHES, J.M., DUNCANSON, P., TERRY, R.S., SMITH, J.E., HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and

cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology*. v. 130, p. 1–7, 2005.

WORK, K. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the flesh of sheep, swine and cattle. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 71, 296-9, 1967.

WONG, S.Y.; REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. *Aids*, v. 07, n. 03, p. 299-316, 1993

ZAMAN, V. Morphology of *Toxoplasma* oocysts and its comparison with other cat coccidian. *South Asian. J. Trop. Med. Pub. Health*, v. 01, n.03, p. 329-335, 1970.