

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

**“TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL EM CAPRINOS
MACHOS, COM ÊNFASE NO SISTEMA REPRODUTOR”**

**Luís Fernando Santana
Médico Veterinário**

**JABOTICABAL - SP
Janeiro de 2007**

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

**“TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL EM CAPRINOS
MACHOS, COM ÊNFASE NO SISTEMA REPRODUTOR”**

Luís Fernando Santana

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

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias –
UNESP, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária (Medicina
Veterinária Preventiva)**

**JABOTICABAL SP
Janeiro de 2007**

Santana, Luís Fernando

S232t Toxoplasmose experimental em caprinos machos, com ênfase no sistema reprodutor / Luís Fernando Santana. – – Jaboticabal, 2007
xiii, 95 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Alvimar José da Costa

Banca examinadora: Anderson Barbosa Moura, Paulo Henrique Franceschini

Bibliografia

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Caprinos reprodutores. 3. Sistema reprodutor. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.616.98:636.38

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luis Fernando Santana – filho de João Batista Filho e Maria Abadia Arduini Santana, nasceu em 24 de Julho de 1979, na cidade de Uberaba – MG. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista – campus de Jaboticabal, em dezembro de 2003. Iniciou em janeiro de 2004 a atividade de pesquisador no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR), pertencente à FCAVJ/UNESP e foi selecionado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva desta mesma instituição. Em janeiro de 2006 foi contratado como professor das disciplinas de Parasitologia e Doenças Parasitárias, para o curso de Medicina Veterinária, no Centro Educacional Anhanguera nas cidades de Leme e Campinas – SP.

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho aos meus pais João e Abadia.
Pelo incansável incentivo em prol da minha realização
profissional.**

A vocês, minha eterna gratidão.

Agradecimentos:

- **A Deus, por sempre me conduzir pelo caminho certo e por ter colocado no meu caminho as pessoas que colocou.**
- **Ao Prof. Alvimar José da Costa, por todos estes longos anos de orientação, conselhos e ensinamentos. Muito obrigado.**
- **A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.**
- **Ao CPPAR, na pessoa do seu supervisor, Prof. Alvimar José da Costa, por ter propiciado condições adequadas para o desenvolvimento deste trabalho.**
- **Aos meus irmãos Fábio e Taciane pelo apoio incondicional prestado ao longo de toda nossas vidas.**
- **Aos amigos Alexandre, Ana Lúcia, Claudinha, Fernando, Tiago, Daniel, Welber, Rafael, Lívia, Tais, Cláudio, Carol, Tatisa, Eloísa e Jouvana pela amizade e ajuda prestada ao longo destes anos.**
- **Aos amigos Paulo Coutinho, Valter, Edimilson, Mateus e Luisinho pela amizade e apoio.**
- **Ao Prof. Gilson pela atenção, companheirismo e invejável paciência em me atender quando preciso.**
- **Aos estagiários Mateus, Ricardo, Carol, Vanessa e Juliana grandes responsáveis por esta pesquisa.**
- **Ao Welber pela inestimável ajuda prestada ao longo destes meses. Meu muito obrigado.**

- **Ao técnico Eugênio de Campos pelo grande auxílio na execução dos exames hematológicos**
- **À Dra. Cristina Kanamura, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio na execução dos exames de Imunohistoquímica**
- **Á todos aqueles que contribuíram para o sucesso desta pesquisa**

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
Resumo.....	1
Abstract.....	2
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Aspéctos Gerais	3
1.2. Toxoplasmose em pequenos ruminantes.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Geral.....	8
2.2. Específicos.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
3.2. Obtenção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
3.3. Obtenção de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
3.4. Seleção e inoculação dos machos reprodutores	11
3.5. Exames clínicos.....	12
3.6. Exames hematológicos.....	13
3.7. Determinação de parasitemia.....	13
3.8. Resposta imune humoral (RIFI).....	13

3.9. Exames no sistema reprodutor dos caprinos	15
3.9.1. Colheita do sêmen.....	15
3.9.2. Parâmetros espermáticos.....	15
3.9.2.1. Motilidade e vigor.....	15
3.9.2.2. Concentração e volume.....	16
3.9.2.3. Morfologia espermática.....	16
3.9.3. Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> no sêmen dos caprinos (Bioprova).....	16
3.9.4. Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> no sêmen dos caprinos (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR).....	17
3.9.4.1. Construção das escalas de diluição de taquizoítos de <i>T.</i> <i>gondii</i>	17
3.9.4.2. Extração do DNA das amostras de sêmen.....	18
3.9.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
3.9.4.4. Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados na PCR.....	20
3.9.5. Pesquisa do <i>Toxoplasma gondii</i> em tecidos do sistema reprodutor dos caprinos.....	21
3.9.5.1. Exames anátomo-histopatológicos	21
3.9.5.2. Bioensaio em camundongos.....	21
3.9.5.3. Imunohistoquímica	22
3.9.5.4. Pesquisa do DNA de <i>T. gondii</i> pela PCR.....	24
3.9.6 – Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Obtenção de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	25

4.2. Obtenção de cistos cerebrais contendo bradizoítos de <i>T.gondii</i>	25
4.3. Obtenção de oocistos de <i>T.gondii</i>	25
4.4. Seleção dos machos reprodutores.....	26
4.5. Exames clínicos.....	27
4.6. Exames hematológicos.....	31
4.7. Determinação de Parasitemia.....	45
4.8. Resposta Imune Humoral..(RIFI).....	47
4.9. Exame do sistema reprodutor dos caprinos.....	49
4.9.1. Parâmetros espermáticos.....	49
4.9.2. Isolamento de <i>T. gondii</i> em amostras seminais (Bioprova).....	54
4.9.3. Pesquisa de DNA de <i>T. gondii</i> no sêmen dos caprinos pela PCR..	56
4.10. Exames anátomo-histopatológicos dos reprodutores.....	56
4.11. Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> nos tecidos dos caprinos (sistema reprodutor).....	56
4.11.1. Bioprova.....	56
4.11.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	57
4.11.3. Imunohistoquímica.....	58
4.12 . Análise estatística.....	60
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Temperatura retal média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*..... 30

FIGURA 2. Frequência cardíaca média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*..... 30

FIGURA 3. Frequência respiratória média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*..... 31

FIGURA 4. Média de valores de hemácias em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 41

FIGURA 5. Média de valores de hemoglobina (g/dL) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 41

FIGURA 6. Média de valores de hematócrito (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 42

FIGURA 7. Média de valores de leucócitos ($n \times 10^3$ /uL) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 42

FIGURA 8. Média de valores de eosinófilos (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 43

FIGURA 9. Média de valores de neutrófilos bastonetes (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 43

FIGURA 10. Média de valores de neutrófilos segmentados (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 44

FIGURA 11. Média de valores de linfócitos (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 44

FIGURA 12. Média de valores de monócitos (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	45
FIGURA 13. Volume espermático médio (mL) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	52
FIGURA 14. Motilidade espermática média (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	52
FIGURA 15. Vigor espermático médio (0 a 5) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	53
FIGURA 16. Patologias espermáticas médias (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	53
FIGURA 17. Concentração espermáticas médias ($\times 10^8$) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	54
FIGURA 18. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir das amostras seminais (amostras de 1 a 11) e do “pool” das amostras de tecidos (testículos, vesícula seminal, próstata e epidídimos – amostras de 12 a 17) dos caprinos experimentalmente infectados.....	57

FIGURA 19. Fotomicrografia de epidídimo de caprino inoculado com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (animal 11) com imunomarcação positiva para *T. gondii* (seta). Aumento de 400x..... 59

FIGURA 20 Fotomicrografia de epidídimo de caprino inoculado com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii* (animal 36) com imunomarcação positiva para *T. gondii*(seta). Aumento de 400x..... 59

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Delineamento experimental dos caprinos reprodutores submetidos à infecção toxoplásmica experimental.....	11
TABELA 2. Protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	20
TABELA 3. Resultados dos exames sorológicos realizados em caprinos machos reprodutores (seleção dos caprinos experimentais).....	27
TABELA 4. Temperatura retal média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>T. gondii</i>	29
TABELA 5. Frequência cardíaca média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>T. gondii</i>	29

TABELA 6. Frequência respiratória média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*..... 29

TABELA 7. Valores totais e médios das contagens de hemácias ($n \times 10^6/\mu\text{L}$) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 32

TABELA 8. Valores médios de hemoglobina (g/dL) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 33

TABELA 9. Valores médios de hematócrito (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 34

TABELA 10. Valores médios das contagens totais de leucócitos ($n \times 10^3/\mu\text{L}$) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 35

TABELA 11. Valores médios das contagens diferenciais de eosinófilos (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 36

TABELA 12. Valores médios das contagens de neutrófilos bastonetes (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 37

TABELA 13. Valores médios das contagens de neutrófilos segmentados (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 38

TABELA 14. Valores médios das contagens de linfócitos (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 39

TABELA 15. Valores médios das contagens de monócitos (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 40

TABELA 16. Parasitemia em Caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*..... 46

TABELA 17. Resíproca dos títulos obtidos pela Reação de Inumofluorescência Indireta (RIFI) nos soros de caprinos não inoculado (controle) e inoculados 48

TABELA 18. Valores espermáticos médios obtidos de caprinos não inoculados (grupo controle)..... 49

TABELA 19. Valores espermáticos médios obtidos de caprinos inoculados com taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	50
---	----

TABELA 20. Valores espermáticos médios obtidos de caprinos inoculados com oocistos esporulados de <i>Toxoplasma gondii</i>	51
--	----

TABELA 21. Presença de <i>Toxoplasma gondii</i> em ejaculados de sêmen de caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5	55
--	----

TABELA 22. Análise estatística dos valores médios das temperaturas retais de caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	61
--	----

TABELA 23. Análise estatística dos valores médios das frequências cardíacas em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> .,.	62
--	----

TABELA 24. Análise estatística dos valores médios das frequências respiratórias em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	63
--	----

TABELA 25. Análise estatística dos valores médios das contagens de hemácias ($n \times 10^6$) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	64
--	----

TABELA 26. Análise estatística dos valores médios de hemoglobina (g/dL) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	65
--	----

TABELA 27. Análise estatística dos valores médios de hematócrito (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	66
---	----

TABELA 28. Análise estatística dos valores médios das contagens totais de leucócitos ($n \times 10^3/uL$) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	67
--	----

TABELA 29. Análise estatística dos valores médios das contagens diferenciais de eosinófilos (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	68
--	----

TABELA 30. Análise estatística dos valores médios das contagens de neutrófilos bastonetes em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	69
--	----

TABELA 31. Análise estatística dos valores médios das contagens de neutrófilos segmentados em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	70
---	----

TABELA 32. Análise estatística dos valores médios das contagens de linfócitos (%) caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	71
---	----

TABELA 33. Análise estatística dos valores médios das contagens de monócitos (%) de caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	72
---	----

“TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL EM CAPRINOS MACHOS, COM ÊNFASE NO SISTEMA REPRODUTOR”

RESUMO

Seis caprinos machos em idade reprodutiva foram selecionados e distribuídos em três grupos: GI – dois caprinos mantidos como controle (placebo), GII – dois caprinos inoculados com 1×10^6 taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) e GIII – dois caprinos inoculados com 2×10^5 oocistos de *T. gondii* (cepa P). Periodicamente foram aferidos parâmetros clínicos, hematológicos e sorológicos, assim como avaliações parasitêmicas, além de exames andrológicos. A presença do parasito no sêmen e, também, nos tecidos do sistema reprodutor foi pesquisada por meio das técnicas de bioprova, PCR e imunohistoquímica. Surtos parasitêmicos foram detectados em todos os animais inoculados com taquizoítos ou com oocistos. A recíproca dos títulos sorológicos (RIFI) alcançou valores máximos de 4096 nos dois grupos de animais que receberam o *Toxoplasma gondii*. Pela técnica da bioprova foi possível revelar precocemente a presença do coccídio nas amostras seminais dos animais inoculados como taquizoítos (5°, 7°, 28°, 49°, 63° e 70° DPI) e um pouco mais tardiamente nas amostras seminais daqueles inoculados com oocistos (56° e 70° DPI). Pela PCR foi possível identificar, no sêmen, material genético de *T. gondii*, em cinco e em duas datas experimentais pós-inoculação dos animais pertencentes aos grupos GII e GIII, respectivamente. Por esta mesma técnica foi possível, ainda, isolar material genético deste protozoário também em amostras teciduais (pool de próstata, testículo, vesícula seminal e epidídimo) dos caprinos 11 e 36 inoculados com taquizoítos e oocistos, respectivamente. Pela imunohistoquímica foi diagnosticado o *T. gondii* no epidídimo de todos os caprinos que receberam o protozoário. O isolamento de *T. gondii*, no sistema reprodutor de caprinos (sêmen e tecidos), sugere a possibilidade da transmissão sexual constituir uma importante via na disseminação desta zoonose tão difundida na caprinocultura mundial.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, caprinos reprodutores, sistema reprodutor.

‘TOXOPLASMOSIS EXPERIMENTAL IN GOAT MALES, WITH EMPHASIS IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM’

ABSTRACT

Six goat males in reproductive age had been selected and distributed in three groups: GI - two goat noninoculated (control), GII - two goat inoculated with 1×10^6 tachyzoites of *T. gondii* (RH strain) and GIII - two goat inoculated with 2×10^5 oocysts of *T. gondii* (P strain). Periodically had been measured clinical parameters, hematologics and sorologics evaluations, as well as parasitemics, beyond andrologics examinations. The presence of the parasite in the semen, and also in tissues of the reproductive system was searched by means of the techniques of bioassay, PCR and immunohistochemistry (only for tissues). Parasitemia was detected in the two animals inoculated with tachyzoites and in the inoculated others two with oocysts. The reciprocal one of the sorologicys titles (RIFI) reached maximal level of 4096 in the two groups of animals inoculated with the *Toxoplasma gondii*. Using bioassay technique was possible precociously to disclose to the presence of the coccidy in the seminal samples of animals inoculated with tachyzoites (5°, 7°, 28°, 49°, 63° e 70° DPI) and a little more delayed in the seminal samples of it inoculated with oocysts (56° e 70° DPI). For the PCR it was possible to identify to the genetic material of the *T. gondii*, in the semen in five and two experimental dates after-inoculação of the pertaining animals to groups GII and GIII respectively. For this same technique was possible still to isolate material genetic of this protozoario also in tissues samples (pool of prostate, testícle, vesícula seminal and epididim) of goat 11 and 36 inoculated with tachyzoites and oocysts, respectively. By the immunohistochemistry was diagnosed *T. gondii* in epididim of all goats ones that had received the protozoario. The isolation of *T. gondii*, in the reproductive system of goat (semen and tissues), suggests the possibility of the sexual transmission to constitute an important way in the dissemination of this zoonose in world caprinoculture.

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*, goats reproducers, reproductive system

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos Gerais

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário de ciclo de vida facultativamente heteroxeno e infecta todas as espécies de animais homeotérmicos, incluindo mamíferos, aves e o ser humano. É uma zoonose de caráter cosmopolita, tendo importância veterinária e médica, por ser causa de aborto e doença congênita em várias espécies de hospedeiros intermediários (TENTER *et al.*, 2000).

Nos Estados Unidos estima-se que um em cada mil crianças nascidas por ano tenha toxoplasmose congênita (JONES *et al.*, 2001). Em certas áreas do Brasil, aproximadamente 60% das crianças de seis a oito anos têm anticorpos contra *T. gondii* em consequência da ingestão de oocistos (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

No homem, em infecções primárias, a doença é usualmente subclínica, mas em alguns pacientes pode ocorrer linfadenopatia cervical ou distúrbios oculares. Em infecções adquiridas durante a gestação (principalmente no primeiro ou segundo trimestre) podem ocorrer danos severos ao feto como morte e aborto espontâneo (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Em pacientes neonatos, a toxoplasmose congênita pode se manifestar de várias formas incluindo hidrocefalia, estrabismo, deficiências visuais, calcificações cranianas, coriorretinite, epilepsia, retardamento mental ou psicomotor, trombocitopenia, anemia (MCAULEY *et al.*, 1994; SWISHER *et al.*, 1994).

As principais vias de transmissão do *T. gondii* são: infecção transplacentária (taquizoítos circulantes) sendo mais freqüente no terço final da gestação (DUBEY e TOWLE, 1986; MAMIDI *et al.*, 2002); ingestão de água, como sugerem os trabalhos de ARAMINI *et al.* (1998 e 1999), ou alimentos contaminados com oocistos esporulados oriundos das fezes do gato e, ainda, ingestão de cistos teciduais em carnes cruas e/ou mal cozidas (SILVA *et al.*, 2000).

Embora menos freqüente, a infecção pode se dar por meio de acidentes laboratoriais (WONG e REMINGTON, 1993), transfusão sangüínea (FIGUEROA-DAMIAN, 1998), transplante de órgãos (MUNIR *et al.*, 2000), e ingestão de leite não pasteurizado (RIEMANN *et al.*, 1975; SACKS *et al.*, 1982; CHIARI *et al.*, 1984). Em mulheres, embora não se tenha comprovado a transmissão por meio da amamentação, BONAMETTI *et al.* (1997) descreveram 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 haviam adquirido toxoplasmose pela ingestão de carne ovina crua. Um inquérito sorológico, na propriedade de origem de tais ovinos, revelou que 43% dos animais eram soropositivos para toxoplasmose.

No seu ciclo evolutivo, o *T. gondii* se apresenta sob três formas principais: 1) taquizoítos, de rápida multiplicação e que ocorrem na infecção aguda; 2) bradizoítos, localizados em cistos teciduais e presentes na infecção crônica e 3) oocistos, produto final da reprodução sexuada e que ocorre somente no trato digestivo de felídeo, seu hospedeiro definitivo (MILLER *et al.*, 1972). Os oocistos são eliminados para o meio juntamente com as fezes dos felídeos onde, após esporulação, tornam-se infectantes.

Após a ingestão, a parede do cisto ou do oocisto se rompe, por ação enzimática, liberando as formas infectantes (bradizoítos e esporozoítos, respectivamente) no trato digestivo do hospedeiro. Penetram então nas células epiteliais do intestino, onde, após multiplicação, transformam-se em taquizoítos. A disseminação ocorre pelo rompimento das células infectadas, seguido da invasão das células vizinhas, distribuindo-se praticamente por todo organismo via circulação sanguínea ou se difundindo de uma célula a outra, podendo, ainda, ser disseminados por macrófagos, linfócitos ou granulócitos, além de circular na corrente sanguínea na sua forma livre.

Os taquizoítos são encontrados somente em células nucleadas, com uma maior afinidade pelos sistemas muscular e nervoso, onde se multiplicam com rapidez até destruí-las.

Com o avanço da infecção, o hospedeiro começa a desenvolver uma resposta imune que atua sobre a multiplicação dos taquizoítos, os quais passam a se dividir mais lentamente, sendo então denominados bradizoítos e que se encontram confinados num

cisto no interior das células parasitadas, protegidos contra a ação do sistema imune e de drogas. É a infecção latente ou crônica, que pode se perpetuar por vários anos (SWANGO *et al.*, 1989).

Normalmente o *T. gondii* parasita seus hospedeiros sem a manifestação de sinais clínicos, porém é capaz de desencadear doença severa, principalmente na forma congênita (DUBEY, 1993).

Além deste ciclo, no hospedeiro definitivo, em especial o gato doméstico, ocorre o ciclo entero-epitelial com esquizogonia e gametogonia, culminando com a fecundação e produção do oocisto (WONG & REMINGTON, 1993). Os felídeos podem se infectar pela ingestão de qualquer uma das três formas evolutivas, sendo a ingestão de cistos com bradizoítos, por meio do carnivorismo, a via mais freqüente (SWANGO *et al.*, 1989).

1.2 Toxoplasmose em pequenos ruminantes

Desde 1954, o parasito é descrito como agente de abortamentos em ovinos, sendo considerado o maior agente causador de problemas reprodutivos nesta espécie animal (UNDERWOOD & ROOK, 1992). Em consequência disso na Nova Zelândia e em alguns países europeus tem sido licenciado o uso de uma cepa atenuada “S48” com o objetivo de minimizar as perdas econômicas neste sistema de produção (MONTROYA & LIESENFELD 2004).

MUNDAY & MASON (1979) foram os primeiros a descreverem a toxoplasmose como importante causa de prejuízos reprodutivos em caprino, e apesar de menos documentada nesta espécie, aparentemente os danos são maiores, acometendo clinicamente tanto animais jovens, como também adultos (DUBEY, 1987). Para as duas espécies, a principal via de infecção é a ingestão de oocistos esporulados do parasito (DUBEY & BEVERLEY, 1988).

As taxas de infecção apontadas para rebanhos caprinos e ovinos são variáveis. Esta flutuação deve-se principalmente ao tipo de teste sorológico utilizado, à região e a

idade dos animais estudados (DUBEY, 1990). Em Minas Gerais, MACHADO & LIMA (1987) encontraram 36,8% de caprinos positivos em 46 propriedades estudadas, com taxas de 36,1% em rebanhos leiteiros e 11,4% nos animais de corte. GONDIM *et al.* (1999) detectaram 18,75% e 28,93% de ovinos e caprinos, respectivamente, positivos ao teste de aglutinação ao látex, em pesquisa realizada no estado da Bahia. No estado de São Paulo, MAINARDI *et al.* (2003) encontrou taxa de 14,5% de animais sorologicamente positivos em sete diferentes regiões criadoras de caprinos leiteiros e, em um levantamento mais recente feito por FIGLIUOLO *et al.* (2004), também no estado de São Paulo, foi observado que a prevalência de toxoplasmose em 19 fazendas, chega a 28,7% dos soros dos caprinos testados. Em outras regiões do território nacional pode se observar prevalência ainda maior da doença, como, por exemplo, no estado do Pernambuco onde foi encontrado índice de até 40,4% em caprinos, oriundos de propriedades localizadas na Zona da Mata e no Agreste, testados pela reação de imunofluorescência indireta (SILVA *et al.*, 2003).

A toxoplasmose é apontada como a segunda causa de abortos em caprinos na França (CHARTIER & MALLEREAU, 2001) e na Suíça (CHANTON *et al.*, 2002). Desordens reprodutivas, como abortos e neonatos mortos ou fracos, que evoluem para óbito geram perdas econômicas consideráveis em rebanhos (VIDOTTO & COSTA, 1987; BRESCIANI *et al.*, 1999).

DUBEY (1987) relata que os resultados referentes às infecções experimentais com oocistos de *T. gondii*, por via oral, em cabras gestantes, variam de acordo com o estágio da prenhez e com o período de inoculação com o parasita.

Toxoplasma gondii foi isolado no sêmen, pela técnica de bioprova, em três caprinos inoculados oralmente com 10^4 oocistos da cepa GT -1. O parasito foi detectado no sêmen sete dias após a inoculação em um dos caprinos e 12 dias pós-infecção, nos outros dois. O período de excreção perdurou até o 59º dias. (DUBEY e SHARMA, 1980).

DUBEY e SHARMA (1980) relatam o isolamento de *T. gondii* em sêmen de caprinos, mas, diferentemente destes autores no presente trabalho foram utilizadas

duas metodologias (bioprova e PCR) nas tentativas de isolamento. Todos os resultados relativos ao sistema reprodutor (parâmetros espermáticos, histopatologia, bioensaio, imunohistoquímica e PCR) são inéditos na literatura compulsada.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos da infecção experimental com oocistos e taquizoítos de *T. gondii* em caprinos machos, com ênfase especial ao sistema reprodutor.

2.2. Específicos

2.2.1 - Avaliar clínica e laboratorialmente caprinos machos, em idade reprodutiva, infectados experimentalmente com oocistos e taquizoítos de *T. gondii*.

2.2.2 - Estudar, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a resposta imune humoral dos animais infectados;

2.2.3 - Demonstrar pelas técnicas de bioprova e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a eventual presença do *T. gondii* em amostras de sêmen colhidas dos caprinos infectados experimentalmente.

2.2.4 - Investigar a presença de *T. gondii* nos tecidos dos caprinos infectados experimentalmente com ênfase para os órgãos do sistema reprodutor (testículo, epidídimo, próstata e vesícula seminal), por meio do bioensaio (inoculação em camundongos), Imunohistoquímica e PCR.

2.2.5 – Dos resultados obtidos, devidamente analisados, extrair inferências sobre a importância do *T. gondii* no sistema reprodutor de caprinos experimentalmente infectados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Cepas de *Toxoplasma gondii*

No presente trabalho foram utilizadas as cepas “P” e “RH”, mantidas junto ao “CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Campus de Jaboticabal. A cepa “P” é capaz de produzir infecções letais, em condições de laboratório, nos camundongos experimentais. Os sobreviventes à infecção normalmente apresentam razoável quantidade de cistos cerebrais. Os oocistos desta cepa são infectantes para camundongos (VIDOTTO *et al.*, 1986) mesmo depois de mantidos durante cinco anos em temperatura de refrigeração (4°C a 8°C).

3.2 – Obtenção de oocistos de *Toxoplasma gondii*

Os oocistos de *Toxoplasma gondii* foram obtidos de forma semelhante à técnica descrita por COSTA *et al.* (1977). Exames coproparasitológicos (Método de Sheather), utilizando-se o volume total de fezes excretadas durante 24 horas por dois gatos, foram realizados, diariamente, durante 15 dias consecutivos pós-infecção com o referido parasita. 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). O material, assim obtido, foi centrifugado (3000 a 4000 rpm por 10 minutos) e com o auxílio de uma pipeta Pasteur foram aspiradas alíquotas do sobrenadante para a pesquisa de oocistos de *T. gondii* em microscópio óptico (objetiva de 40X). Aos oocistos, assim obtidos, foi adicionada solução de ácido sulfúrico a 2% para auxiliar na esporulação. O material foi

mantido em temperatura ambiente, parcialmente fechado e aerado mecanicamente duas vezes ao dia, durante três a sete dias, até completa esporulação. 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 feita pela mensuração dos oocistos (10 a 12 micrômetros) em régua micrométrica ocular calibrada para a objetiva de aumento 40X do microscópio óptico, conforme ZAMAN (1970) e inoculações intraperitoneais em camundongos (DUBEY *et al.*, 1972). Após a identificação, foi feita a quantificação total dos oocistos utilizando-se câmara de Neubauer.

3.3 – Obtenção de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Para a obtenção de taquizoítos de *T. gondii*, foram utilizados camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) os quais foram testados periodicamente para a infecção toxoplásmica por meio da RIFI. Estes animais receberam, via intraperitoneal, exsudatos peritoneais, colhidos por meio de injeção e posterior aspiração de 1,0 mL de solução fisiológica, contendo taquizoítos de *T. gondii* (Cepa RH). Decorridos dois dias da inoculação, estes camundongos foram eutanasiados e então realizados lavados intraperitoneais com injeção de 1,0 mL de solução fisiológica estéril e posterior aspiração. Em seguida estes lavados intraperitoneais foram avaliados em microscopia optica (objetiva de 40X) para concentração, viabilidade e morfologia dos taquizoítos, objetivando a obtenção dos inóculos a serem utilizados nos caprinos, seguindo metodologia proposta por COSTA (1979).

3.4 – Seleção e inoculação dos machos caprinos.

Foram selecionados seis caprinos machos, com idade entre um e cinco anos, sorologicamente negativos para *T. gondii*. A técnica sorológica empregada foi a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo CAMARGO (1964). Foram considerados positivos todos os animais com títulos sorológicos a partir da diluição 1:16. Os animais selecionados foram identificados, sorteados e distribuídos para posterior inoculação, conforme o delineamento experimental expresso na Tabela 1.

Tabela 1. Delineamento experimental dos caprinos reprodutores submetidos à infecção toxoplásmica.

Grupo	Nº de caprinos	Oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	Via de inoculação
A	2		Placebo	Oral
B	2	-	1×10^6	Subcutânea
C	2	2×10^5	-	Oral

Todos os animais foram mantidos em baias individuais, pertencentes ao CPPAR (Centro de Pesquisas em Sanidade Animal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP. Água e alimentação foram fornecidas “ad libitum”. Vermifugação foi executada durante a fase de adaptação dos animais.

Dois animais receberam oocistos de *T. gondii*, via oral, por meio de uma seringa acoplada a uma sonda de metal, depositando assim o inóculo diretamente no esôfago dos animais, após jejum prévio de 12 horas. Em seguida, 200 mL de solução

fisiológica, foram administrados aos animais a fim de se remover possíveis oocistos que eventualmente estivessem aderidos à seringa e/ou sonda.

Dois animais foram infectados com taquizoítos, via subcutânea, utilizando-se seringas e agulhas devidamente esterilizadas conforme descrito por BRESCIANI (2003). Dois caprinos receberam solução fisiológica, via oral, constituindo o grupo controle.

As fezes dos caprinos inoculados com oocistos foram removidas e tratadas com desinfetante, diariamente, por sete dias consecutivos após a infecção, para a destruição dos oocistos eventualmente presentes nos dejetos dos animais experimentais.

Exames sorológicos para a detecção de anticorpos contra doenças infecciosas que possam provocar desordens reprodutivas, como brucelose e leptospirose, foram realizados previamente e mensalmente durante o experimento. Para brucelose foi empregada 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 própria. 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. No caso da leptospirose, a técnica empregada foi a Prova de Soroaglutinação Microscópica. Os soros foram testados contra os sorovares *pomona*, *icterohaemorrhagiae* e *hardjo*. O critério adotado para considerar um soro reagente foi de 50% de aglutinação no título final de 1:100, ou seja, metade das leptospirosas 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).

3.5 – Exames clínicos

Dados clínicos (frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal) dos animais experimentais foram colhidos dois dias antes da inoculação e no 3°, 5°, 7°, 11°, 14°, 21°, 28°, 35°, 42°, 49°, 56°, 63° e 70° dias pós-inoculação.

3.6 – Exames hematológicos

Hemogramas foram realizados, em todos os animais, nos dias 3, 7, 11, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 pós-inoculação. Técnicas usuais de hematimetria foram empregadas na realização dos hemogramas. Para tanto foi colhido 1 mL de sangue, por meio de punção da veia jugular com agulhas 40 X 12. As amostras de plasma foram acondicionadas em microtubos (ependorf) estéreis contendo solução de ácido etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA) a 10% conforme recomendado por ROSENFELD (1995). Os hemogramas foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV/UNESP.

3.7 – Determinação da parasitemia

Para esta etapa experimental amostras de sangue (10 mL) dos animais inoculados e controles foram colhidas em tubo estéril contendo EDTA, nas mesmas datas dos hemogramas. Após centrifugação (3000 rpm por 15 minutos), a camada leucocitária foi cuidadosamente aspirada com auxílio de pipeta Pasteur e inoculada, intraperitonealmente, em grupos de três 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 da 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 dos mesmos. Nos animais que morreram a partir do 11º até o 42º DPI, realizou-se a pesquisa de anticorpos séricos contra *T. gondii* (RIFI), além da pesquisa de cistos teciduais nas amostras de cérebro.

3.8 – Resposta Imune humoral

Nos soros de todos os caprinos reprodutores infectados experimentalmente, obtidos de amostras de sangue colhidas dois dias anteriores à inoculação e nos dias 1,

3, 5, 7, 11 e 14 após a infecção e, semanalmente, até o fim do experimento, foram pesquisados anticorpos contra *T. gondii* pela RIFI (CAMARGO, 1964).

A colheita de sangue foi feita em tubo de ensaio estéreis por meio de punção da veia jugular com agulha 40 x 16 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 congelamento (-20°C).

Para a realização da RIFI, foi utilizado como antígeno taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, obtidos de lavado intraperitoneal, com solução salina estéril acrescida de heparina (25µL de heparina em 50 mL de solução salina), de camundongos no segundo dia pós-infecção, inativados por formol a 0,5%, em estufa a 37°C por 30 minutos. Após centrifugação (um minuto a 500 rpm) para sedimentar células do exsudato peritoneal, o sobrenadante recolhido foi novamente centrifugado (10 minutos a 1500 rpm) e o sobrenadante obtido agora, desprezado. 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 ao número 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 então colocados em “poços” (impressos em lâminas de microscopia pela técnica de “Silk Screen”). As lâminas contendo o antígeno foram então 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 sua utilização.

Os soros dos caprinos foram diluídos em PBS em múltiplos de 4 (1:16 até 1:4096). Dezesesseis microlitros de cada diluição de cada soro foram adicionados 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, as 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 caprino/ovino marcado com isotiocianato de

fluoresceína e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida (37°C por 40 minutos) em estufa, lavadas duas vezes 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).

3.9 – Exames no sistema reprodutor dos caprinos

3.9.1 – Colheita do sêmen

Durante aproximadamente 2 meses, os seis caprinos foram freqüentemente submetidos ao “treinamento” para a colheita de sêmen com o uso do eletro-ejaculador.

Dos seis caprinos experimentais foram obtidas amostras de ejaculados, dois dias antes da inoculação e nos dias 3, 5, 7, 11, 14 e semanalmente até o final do experimento para que fossem avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: volume, motilidade, concentração, vigor e morfologia (MIES FILHO *et al.*, 1992).

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 espermatozóides.

Imediatamente após o término da ejaculação, o tubo contendo o sêmen era colocado em banho-maria (38 a 40°C) para garantir a integridade espermática.

3.9.2 – Parâmetros espermáticos

3.9.2.1 - 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), uma alíquota do sêmen coletada de cada um dos caprinos

(aproximadamente 10µL), nas datas experimentais especificadas, foi colocada sobre lâmina e recoberta por lamínula (previamente aquecidas a 38°C) e observada ao microscópio óptico (aumentos de 10 e 40X) imediatamente após a colheita. Os dados foram expressos em porcentagem (motilidade) e numa escala de 0 a 5 (vigor) e anotados em fichas próprias para posterior análise.

3.9.2.2 - Concentração e volume

Para análise da concentração espermática foram obtidas alíquotas de 5µL, diluídas em 4995µL de solução salina formol. A concentração foi estimada por meio da contagem em câmara de Neubauer, sendo o volume seminal mensurado por meio da observação direta dos tubos graduados no momento da colheita.

3.9.2.3 - Morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática foram obtidas alíquotas de 50µL, 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 o Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (1998).

3.9.3 – Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos caprinos (Bioprova)

Para o isolamento de *T. gondii* das amostras de sêmen colhidas, foi utilizada a metodologia proposta por TEALE *et al.* (1982), modificada. Amostras de sêmen de cada animal (infectados e controles) foram inoculados em cinco camundongos, via intraperitoneal, com alíquotas de aproximadamente 0,4 mL do ejaculado. Os camundongos foram observados e examinados, conforme descrito para aqueles que

receberam camadas leucocitárias para a determinação da parasitemia (OLIVEIRA, 1997), como descrito no item 3.7.

3.9.4 – Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos caprinos (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR)

Parte da suspensão espermática ressuspensa de cada amostra de sêmen (item 3.9.1) era fracionada em alíquotas de 1 mL e devidamente armazenadas para posterior processamento e avaliação pela técnica de PCR (FUENTES *et al.*, 1996).

3.9.4.1 – Construção das escalas de diluição de taquizoítos de *T. gondii*

Uma escala de diluições sucessivas de taquizoítos da cepa “RH” de *T. gondii* foi preparada para ser utilizada como controle da PCR na determinação da sensibilidade da técnica.

Taquizoítos da cepa “RH” de *T. gondii* foram contados em câmara de Neubauer modificada, em microscópio de campo escuro (objetiva 400x), tendo sua concentração ajustada para 10^{10} parasitos/mL. A partir desta diluição inicial, 500µL foram diluídos em 9,5 mL de SST estéril e assim, sucessivamente, obtendo-se as diluições de 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 parasitos por mL de amostra.

As diluições foram aliqüotadas em volume de 700µL e o DNA de cada amostra extraído.

3.9.4.2 - Extração do DNA das amostras de sêmen

Todas as amostras seminais obtidas ao longo do experimento foram avaliadas quanto à presença do *T. gondii* pela PCR.

O DNA de *T. gondii* das escalas de diluição (controle positivo) e das amostras de sêmen para a detecção do DNA de *T. gondii* foi extraído segundo metodologia preconizada por ZADWORNÝ e KUHLEIN (1990).

Uma alíquota de 100µL do sêmen previamente preparado para a extração de DNA, conforme item 3.9.4, foi transferida para um microtubo de 1500 µL. A esta, foram acrescentados 900 µL 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 µL de PBS e 400 µL 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 5µL de Proteinase K (200µg/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 900µL 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 µL 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 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.

3.9.4.3 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Esta etapa experimental foi realizada seguindo a técnica descrita por FUENTES *et al.* (1996). Para a detecção do DNA de *Toxoplasma gondii* foi amplificado um fragmento do gene B1 de uma sequência de 194 pares de base (bps), utilizando-se os iniciadores 5' –GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG–3' (B1₁) e 5'- TCTTTAAGAGTTCGTGGTC –3' (B1₂). As amostras a serem amplificadas eram previamente expostas a 95°C durante dois minutos. As reações eram realizadas com um volume final de 50µL com 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (primers), 1mM de MgCl₂, 200mM de mistura de dNTPs, uma concentração de DNA de 40ng/µL e Taq polimerase (1U/reacção). Em seguida, eram realizados 35 ciclos de amplificação em termociclador programado conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

PASSO	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).

3.9.4.4 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados na PCR

Alíquotas de 15µL do material amplificado pela PCR foram separados por eletroforese (95 volts, 90 minutos de corrida em tampão TBE1X) em géis de agarose na concentração de 2%, corados com brometo de etídio. Posteriormente, os géis eram fotografados, com o auxílio de um transluminador de luz ultra-violeta, a fim de identificar a presença, ou não, do fragmento 194 pb característico do *T. gondii* (FUENTS *et al.*, 1996).

3.9.5 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* em tecidos do sistema reprodutor dos caprinos

3.9.5.1 - Exames anátomo-histopatológicos

Estes exames foram realizados em todos os seis caprinos, inclusive os do grupo controle, os quais foram sacrificados ao final do experimento e colhidas amostras de testículos, vesículas seminais, epidídimos e próstatas para os exames histopatológico, imunohistoquímico e para isolamento de *T. gondii* por meio da técnica da bioprova. Para os exames histopatológicos e imunohistoquímicos, 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 levados à microtomia, obtendo-se assim cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas silanizadas e incubadas em estufa a 55°C por seis horas para fixação dos cortes (MOURA, 2004). Para a técnica da bioprova, o material colhido foi processado conforme descrito no item a seguir.

3.9.5.2 - Bioensaio em camundongos

Para esta etapa experimental foi feito, para cada um dos seis animais, um “pool” de aproximadamente 100g dos tecidos colhidos após necrópsia (testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata). Conforme técnica descrita por DUBEY *et al.* (1980), estas amostras sofreram digestão péptica antes da inoculação em 15 camundongos cada. Um volume de 400 mL de solução de pepsina a 1% (6g de pepsina, 600 mL de H₂O e 10mL de ácido clorídrico PA) foi adicionado ao erlenmeyer contendo tecidos colhidos na necropsia. Estas amostras teciduais foram trituradas e mantidas em agitação constante sob temperatura de 37°C (estufa BOD) durante duas horas para a completa digestão dos tecidos. Em seguida, o material foi filtrado com gaze cirúrgica, transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado (3000 rpm por 10 min), sendo descartado o

sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em solução salina (10 X o volume) e novamente centrifugado (3000 rpm por 10 min). Mais duas lavagens foram realizadas para remoção da solução de pepsina, que poderia digerir os possíveis cistos presentes nas amostras. Após a última lavagem o material foi ressuspenso em solução tampão PBS contendo antibiótico (ampicilina, 1mg/mL).

Os 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 seu exsudato peritoneal, além da realização de “imprint” de pulmão. Os sobreviventes foram exsanguinados para a obtenção de soros para a pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* (RIFI - CAMARGO, 1964).

3.9.5.3 – Imunohistoquímica

Fragmentos de testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata dos caprinos reprodutores (controle e inoculados), colhidos e processados conforme item 3.9.5.1, foram analisados pela imunohistoquímica para pesquisa de possíveis antígenos de *T. gondii*. Para tanto, foi utilizado o método imuno-enzimático de amplificação com o complexo estrepto-avidina com peroxidase-biotina (Kit LSAB/HRP, Dako, USA) conforme GUESDON *et al.* (1979).

Os tecidos incluídos em parafina foram submetidos à microtomia para obtenção de secções histológicas de 3µm de espessura, estendidas em lâminas silanizadas e incubadas em estufa a 55°C por seis horas para fixação dos cortes. Os cortes histológicos foram submetidos a desparafinização em xilol, seguida de banhos em álcoois gradualmente hidratados (álcool absoluto, álcool a 95%, álcool a 80%) e em água destilada.

Foi empregado anticorpo policlonal contra *T. gondii* produzido por MINEO (2002 – comunicação pessoal), cuja diluição otimizada para o ensaio imunohistoquímico foi de 1:5000.

Após desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos a dois banhos (10 min) em peróxido de hidrogênio a 6%, para bloqueio da peroxidase endógena, seguidos de lavagens em água destilada e solução tampão (PBS – pH 7,2).

O anticorpo foi diluído a 1:5000 em solução de soroalbumina bovina (BSA) a 1% em PBS contendo 0,1% de azida sódica. O BSA foi utilizado para o bloqueio de possíveis ligações inespecíficas entre outras proteínas presentes na solução de anticorpos e os tecidos em estudo, evitando-se, desta forma, reações espúrias (“de fundo”).

O anticorpo diluído foi, então, aplicado aos cortes e estes incubados em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e, em seguida, a 4°C por 18 horas. Após este procedimento, foram realizadas três lavagens em PBS, de 5 minutos cada, seguindo-se nova incubação com anticorpo biotinilado (solução de anticorpos biotinilados contra imunoglobulinas de coelho/camundongo/cabra), em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas três lavagens em PBS (5 min cada) e o material foi então incubado com estrepto-avidina-biotina-peroxidase, em câmara úmida a 37°C por 30 min.

Após nova etapa de lavagens em PBS (3 banhos de 30 min cada), as amostras foram reveladas por meio de um banho em solução contendo substrato (peróxido de hidrogênio a 0,1%) e cromógeno (diaminobenzidina 60 mg%, Sigma D5637, USA) em PBS. Na sequência, o material foi lavado em água corrente e em água destilada e submetido a contracoloração em hematoxilina de Harris. Finalizando o procedimento, o material foi desidratado em álcoois, diafanizado em xilol e montado entre lâmina e lamínula empregando resina sintética (Entellan, Merck, Germany).

A reação foi acompanhada de controles positivo e negativo, sendo este último submetido a todas as etapas do procedimento técnico, suprimindo-se, entretanto, a aplicação do anticorpo primário contra *T. gondii*. A presença do antígeno foi revelada pela coloração acastanhada assumida pelo parasita presente no tecido.

3.9.5.4 – Pesquisa do DNA de *T. gondii* pela PCR

Foi realizado um pool dos tecidos do aparelho reprodutor (testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata) dos reprodutores (inoculados e controle), e devidamente armazenados para posterior processamento da técnica de PCR conforme item 3.9.4.

3.9.6 – Análise estatística

Os parâmetros pré e pós-inoculação foram avaliados por meio de análise de variância com medidas repetidas no tempo, sendo um fator entre os animais, com três níveis (controle, taquizoítos e oocistos) e um fator dentro dos animais, com 12 ou 13 níveis (tempo). Para este fim foi utilizado o método de Scott e Knott proposto por Ramalho *et al.* (2000).

4 - RESULTADOS

4.1 - Obtenção de taquizoítos de *T. gondii*

Após padronização da técnica para manutenção da cepa “RH” de *T.gondii* em camundongos, foi possível obter lavados peritoneais ricos em taquizoítos. Após avaliação, os mesmos eram inoculados em novos camundongos, procedendo assim, a cada dois dias a fim de se manter a cepa em condições de uso. Para obtenção dos inóculos, contendo taquizoítos, que foram destinados aos caprinos experimentais, camundongos foram sacrificados, os taquizoítos recuperados de lavados peritoneais, padronizados e imediatamente inoculados nos reprodutores.

4.2 - Obtenção de cistos cerebrais contendo bradizoítos de *T.gondii*

Camundongos inoculados intraperitonealmente com a cepa “P” foram medicados com sulfadiazina, durante 10 dias, para obtenção de maiores quantidades de cistos de *T. gondii*. Decorridos 30 dias pós-inoculação, 20 camundongos foram sacrificados, sendo removidos os respectivos encéfalos para a coleta dos cistos presentes.

4.3 - Obtenção de oocistos de *T.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 esporulados 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 aproximadamente 485 000 oocistos esporulados.

Do segundo gato, inculado com 885 cistos de *T. gondii*, foi possível recolher 612 500 oocistos esporulados eliminados em três dias (5º, 6º e 7º DPI), ocorrendo o pico de liberação no sexto dia pós-inoculação .

Os felinos inoculados não apresentaram nenhuma alteração da higidez que pudesse ser evidenciada pelos parâmetros clínicos avaliados (temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória) diariamente.

Os oocistos produzidos foram confirmados como de *T. gondii* por meio de critérios morfológicos (ZAMAN, 1970) e pela infectividade utilizando-se inoculação intraperitoneal em camundongos (2500 oocistos por animal, totalizando 15 camundongos). Tais camundongos vieram a óbito entre o 10º e o 12º dia pós-inoculação. No lavado peritoneal de 80,0% destes camundongos foram encontrados taquizoítos viáveis em quantidades variadas. Os camundongos sobreviventes, após seis semanas de inoculação, apresentaram cistos cerebrais de *T.gondii*.

4.4 - Seleção dos machos reprodutores

Pelos resultados dos exames sorológicos realizados em 60 machos, relativos à presença de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella abortus* e *Leptospira sorovares pomona*, *icterohaemorrhagea* e *hardjo*, foi possível selecionar seis machos negativos para as quatro enfermidades supracitadas.

Estes resultados sorológicos encontram-se sumariados a seguir:

Tabela 3: Resultados dos exames sorológicos realizados em caprinos machos reprodutores (seleção dos caprinos experimentais).

Sorologia	Toxoplasmose	Neosporose	Brucelose	Leptospirose
Positiva	42	04	16	11
Negativa	18	56	44	49
Total	60	60	60	60

4.5 - Exames clínicos

Os resultados referentes aos parâmetros clínicos avaliados nos caprinos experimentais estão sumariados (médias dos grupos) nas Tabelas 4, 5 e 6 e ilustrados nas Figuras 1, 2 e 3. Considerando como parâmetro de normalidade a variação de 38,5 a 40,5°C, hipertermia foi detectada apenas no 5^o dia após a inoculação de oocistos (G III). Em várias datas experimentais foi possível também aferir temperaturas retais médias abaixo de 38,5°C tanto nos animais dos grupos inoculados quanto naqueles pertencentes ao grupo controle, o que nos leva a crer que as condições ambientais favoreceram esta queda de temperatura, não sendo portanto, hipotermia devida a inoculações do parasita.

No que se refere às frequências cardíacas médias (Tabela 5 e Figura 2) podemos dizer que, na literatura os parâmetros ditos de normalidade para esta espécie estão compreendidos entre 70 e 90 batimentos por minuto, mas, no entanto, em várias datas experimentais este valor máximo (90 bat/min) foi superado tanto pelos animais inoculados com oocistos ou taquizoítos, como também naqueles pertencentes ao grupo controle, sendo portanto esta extrema variação atribuída ao estresse ocasionado no manejo dos animais.

Com base na Tabela 6 e Figura 3 que se referem à frequência respiratória média dos grupos e tendo como parâmetros de normalidade frequência respiratória

compreendida entre 20 a 30 movimentos por minuto, e, tendo por base os resultados encontrados para os animais do grupo controle não podemos também atribuir nenhuma destas variações à infecção com *Toxoplasma gondii*, sendo portanto estes valores considerados normais para esta condição experimental.

Tabela 4: Temperatura retal média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*.

Grupos	Dias pós-inoculação/Temperatura retal média													
	-2	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I	39,55	38,55	38,05	38,9	37,15	36,9	38,05	38,6	38,6	38,55	38,15	38,3	38,8	38,85
II	39,75	37,75	39,2	39,8	38,3	37,85	38,4	38,35	37,55	38,3	39,15	38,75	38,45	38,95
III	39,85	38,5	40,65	40,3	39,05	38,35	37,6	38,65	38,8	38,75	38,8	38,6	38,7	38,65

I: Controle, II: Inoculados com taquizoítos, III: Inoculados com oocistos esporulados

Tabela 5: Frequência cardíaca média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*.

Grupos	Dias pós-inoculação/Frequência cardíaca média (bat/min)													
	-2	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I	120	72	82	105	105	80	100	114	96	118	92	76	93	99
II	110	68	78	120	100	76	90	108	80	100	114	126	112	112
III	118	80	126	140	70	112	96	96	97,5	160	94	73	106	118

I: Controle, II: Inoculados com taquizoítos, III: Inoculados com oocistos esporulados

Tabela 6: . Frequência respiratória média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*.

Grupos	Dias pós-inoculação/Frequência respiratória média (mov./min)													
	-2	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I	24	16	16	26	22	24	26	24	14	20	26	16	18	24
II	54	22	26	22	24	20	24	24	18	22	28	20	22	21
III	28	20	36	28	22	22	22	22	17	24	30	14	18	20

I: Controle, II: Inoculados com taquizoítos, III: Inoculados com oocistos esporulados

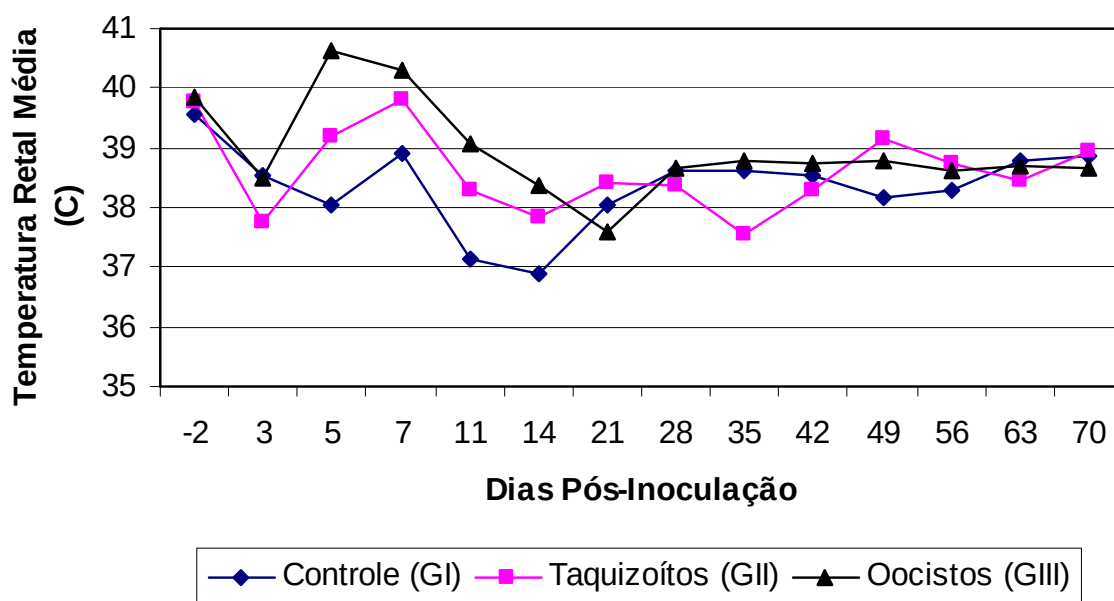


Figura 1. Temperatura retal média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*.

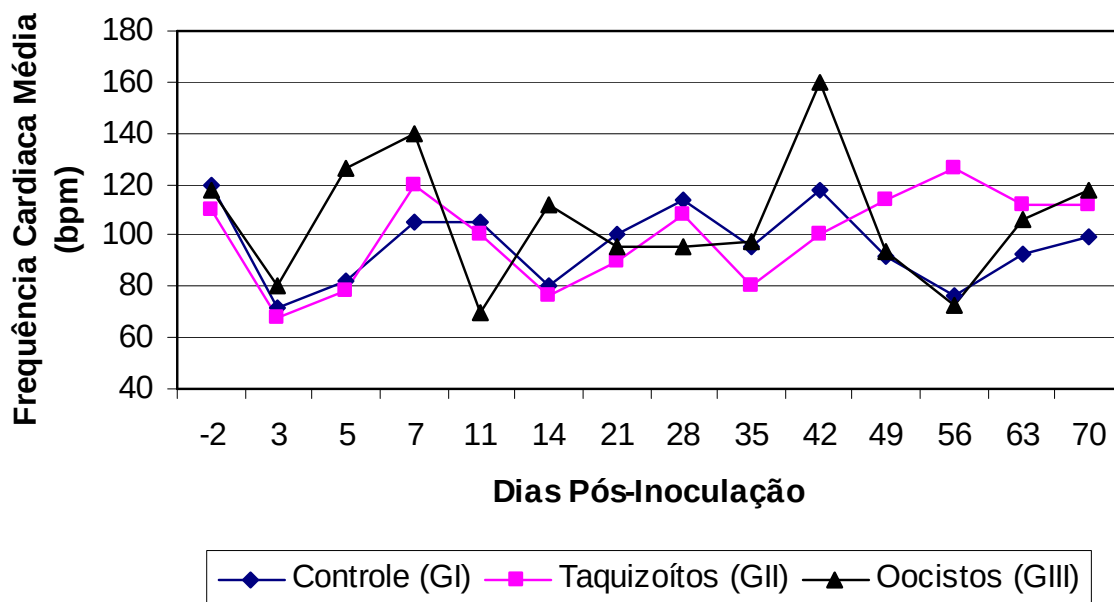


Figura 2. Frequência cardíaca média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*.

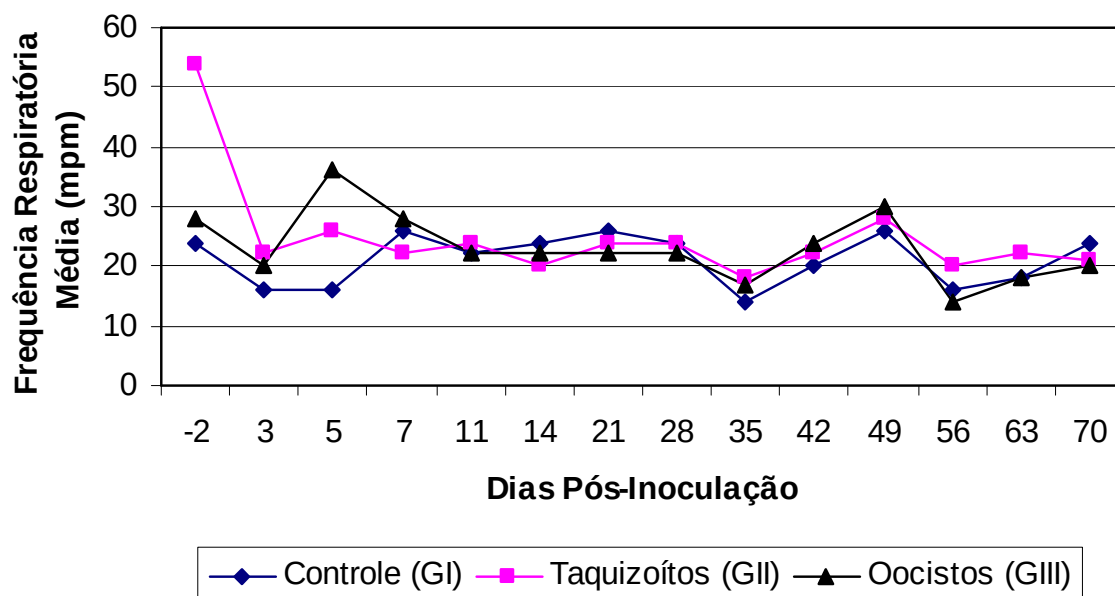


Figura 3. Frequência respiratória média mensurada nos caprinos experimentais pertencentes aos grupos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *T. gondii*.

4.6 - Exames hematológicos

Os parâmetros hematológicos observados nos hemogramas efetuados nos caprinos experimentais estão registrados nas Tabelas 7 a 15 e ilustrados nas Figuras 4 a 12.

Tabela 7. Valores totais e médios das contagens de hemácias ($n \times 10^6/\mu\text{L}$) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Nº do caprino	Contagens totais de hemácias ($n \times 10^6/\mu\text{L}$) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	17300	17000	15560	15366	14500	13600	17900	15300	16580	18565	21700	16700
	41	16300	16000	16700	18655	18550	19600	18800	16700	17500	19825	32000	18000
Média		16800	16500	16130	17011	16525	16600	18350	16000	17040	19195	26850	17350
II (Taquizoítos)	1	19900	18000	16410	16413	16580	16650	10600	18350	19540	17520	17800	18100
	11	16700	17800	14360	14911	13000	10500	16900	12600	13100	15620	16580	17700
Média		18300	17900	15385	15662	14790	13575	13750	15475	16320	16570	17190	17900
III (Oocistos)	36	18100	17100	15900	16660	17560	20850	17555	15800	15890	17895	33200	15900
	47	16400	17500	16690	15662	16330	18100	17300	17550	17950	18560	25600	18700
Média		17250	17300	16295	16161	16945	19475	17300	16675	16920	18228	29400	17300

Tabela 8. Valores médios de hemoglobina (g/dL) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Nº do caprino	Concentração médias de hemoglobina (g/dL) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	13,62	12,35	11,57	11,82	11,8	11,9	14,1	11,28	11,29	11,52	10,21	9,29
	41	12,59	12,62	12,86	14,35	14,2	14,1	14,7	13,12	12,35	11,3	11,44	10,71
Média		13,1	12,48	12,21	13,08	13	13	14,4	12,2	11,82	11,4	10,82	10
II (Taquizoítos)	1	15,35	13,56	12,63	12,63	12,71	12,9	14,8	12,32	12,12	11,32	10,56	10,17
	11	12,89	12,58	11,05	11,47	11,52	11,9	13,1	9,59	9,58	9,55	9,52	9,06
Média		14,12	13,07	11,84	12,05	11,12	12,4	13,95	10,95	10,85	10,43	10,04	9,61
III (Oocistos)	36	13,93	13,52	12,24	12,82	13,5	14	13,1	11,28	11,28	11,33	11,13	10,9
	47	12,66	12,78	12,84	11,74	12,52	13,6	14,1	13,12	13,65	12,55	11,24	10,67
Média		13,29	13,15	12,54	12,28	13,01	13,8	14,1	12,2	12,46	11,94	11,18	10,78

Tabela 9. Valores médios de hematócrito (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*

Grupo	Nº do caprino	Valores totais de hematócrito (%) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	35	33	35	35	33	30	32	31	29	30	28	27
	41	39	38	36	40	38	34	36	33	32	31	29	28
Média		37	35,5	35,5	37,5	35,5	32	34	32	30,5	30,5	28,5	27,5
II (Taquizoítos)	1	40	37	36	38	36	25	39	36	35	34	33	31
	11	35	32	33	40	39	34	30	26	28	28	27	29
Média		37,5	34,5	34,5	39	37,5	29,5	34,5	31	31,5	31	30	30
III (Oocistos)	36	38	35	36	35	35	35	32	31	32	31	30	29
	47	34	38	35	37	36	34	36	33	32	30	29	30
Média		36	36,5	35,5	36	35,5	34,5	34	32	32	30,5	29,5	29,5

Tabela 10. Valores médios das contagens totais de leucócitos ($n \times 10^3/\mu\text{L}$) em caprinos não inoculados (controle) e inoculado com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Nº do caprino	Contagens totais de leucócitos ($n \times 10^3$) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	11500	9500	9200	7000	7500	7600	7500	9700	9500	8500	7250	13100
	41	9500	9000	6100	7700	7600	9350	8500	6200	7560	9560	10800	10000
Média		10500	9250	7650	7350	7550	8475	8000	7950	8530	9030	9025	11550
II (Taquizoítos)	1	10000	9550	7800	7500	7570	7850	8000	11150	11250	11000	11300	11700
	11	9200	7750	8250	8700	8500	8300	7000	6550	9540	10100	16540	17700
Média		9600	8650	8025	8100	8035	8075	7500	8850	10395	10550	13920	14700
III (Oocistos)	36	7500	6500	5100	9300	8650	6350	6550	5800	5980	6500	6900	9100
	47	9500	7000	6100	7400	7500	7550	11000	8800	8980	8500	7100	9000
Média		8500	6750	5600	8360	8075	6950	8775	7300	7480	7500	7000	9050

Tabela 11. Valores médios das contagens diferenciais de eosinófilos (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Nº do caprino	Contagens diferencial se eosinófilos (%) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	2	2	3	4	21	0	1	1	1	1	1	2
	41	1	7	3	4	1	2	2	0	0	1	1	1
Média		1,5	4,5	3	4	1,5	1	1,5	0,5	0,5	1	1	1,5
II (Taquizoítos)	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
	11	1	0	2	0	0	1	4	4	3	0	1	0
Média		1,5	1	2	1	1	1,5	3	2,5	2	0,5	1	0,5
III (Oocistos)	36	3	1	1	2	2	0	0	0	0	1	2	1
	47	1	1	0	0	1	2	1	3	2	1	1	5
Média		2	1	0,5	1	1,5	1	0,5	1,5	1	1	1,5	3

Tabela 12. Valores médios das contagens de neutrófilos bastonetes (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*

Grupo	Nº do caprino	Contagens totais de neutrófilos bastonetes (%) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	41	0	0	0	4	0	2	0	0	1	0	0	0
Média		0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0,5	0,5
II (Taquizoítos)	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Média		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
III (Oocistos)	36	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	47	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
Média		0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1

Tabela 13. Valores médios das contagens de neutrófilos segmentados (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*

Grupo	Nº do caprino	Contagens totais de neutrófilos segmentados (%) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	51	58	53	24	32	48	51	48	50	52	67	25
	41	36	51	31	32	38	41	57	45	52	54	68	37
Média		43,5	54,5	42	28	35	44,5	54	46,5	51	53	67,5	31
II (Taquizoítos)	1	72	63	26	27	30	33	46	78	62	42	22	19
	11	57	57	41	28	42	59	37	52	50	45	32	18
Média		64,5	60	33,5	27,5	32	46	41,5	65	56	43,5	27	18,5
III (Oocistos)	36	45	57	29	41	45	50	55	44	47	55	60	73
	47	72	46	22	20	30	50	58	34	45	62	73	68
Média		58,5	51,5	25,5	30,5	37,5	50	56,5	39	46	58,5	66,5	70,5

Tabela 14. Valores médios das contagens de linfócitos (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*

Grupo	Nº do caprino	Contagens totais de linfócitos (%) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	48	39	44	72	55	52	48	50	48	45	30	25
	41	62	41	66	60	57	54	41	55	51	32	29	37
Média		55	40	55	66	56	53	44,5	52,5	49,5	38,05	29,5	31
II (Taquizoítos)	1	26	33	91	70	66	63	51	21	25	29	30	19
	11	41	43	57	72	60	39	58	44	42	40	36	18
Média		33,5	38	74	71	63	51	54,5	32,5	33,5	34,5	33	18,5
III (Oocistos)	36	49	41	67	56	53	50	51	55	51	43	36	24
	47	27	47	78	80	52	47	41	60	45	33	23	22
Média		38	44	72,5	68	52,5	48,5	46	57,5	48	38	29,5	23

Tabela 15. Valores médios das contagens de monócitos (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Nº do caprino	Contagens totais de monócitos (%) / Dias Pós-inoculação											
		3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
I (Controle)	32	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
	41	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1
Média		0,5	1	0	0	0	1	0	0	0	0,5	1,5	1,5
II (Taquizoítos)	1	0	2	3	1	1	1	1	0	0	0	1	3
	11	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
Média		0,5	1	1,5	0,5	0,5	0,5	1	0	0	0	1	2,5
III (Oocistos)	36	3	1	3	1	0	0	0	0	0	1	1	2
	47	0	4	0	0	0	0	0	2	2	2	2	3
Média		1,5	2,5	1,5	0,5	0	0	0	1	1	1,5	1,5	2,5

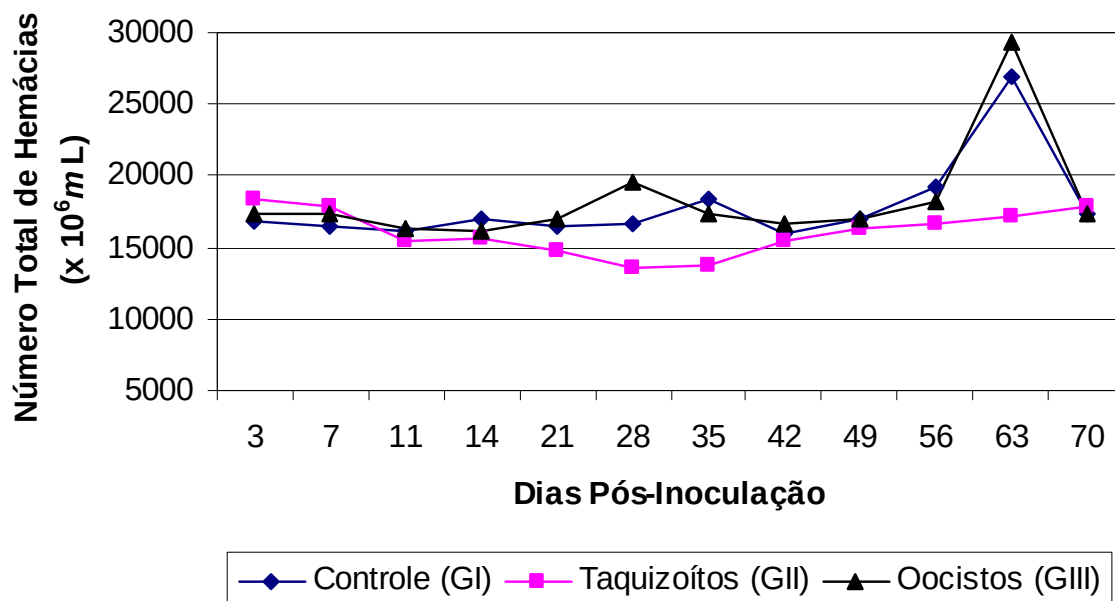


Figura 4. Média de valores de hemácias em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

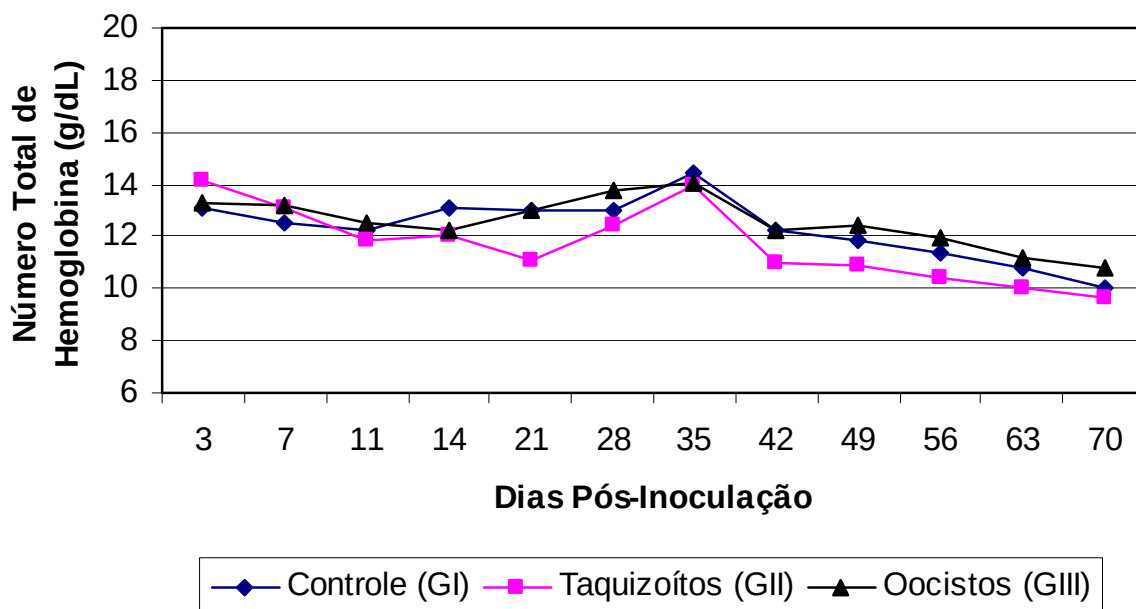


Figura 5. Média de valores de hemoglobina (g/dL) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

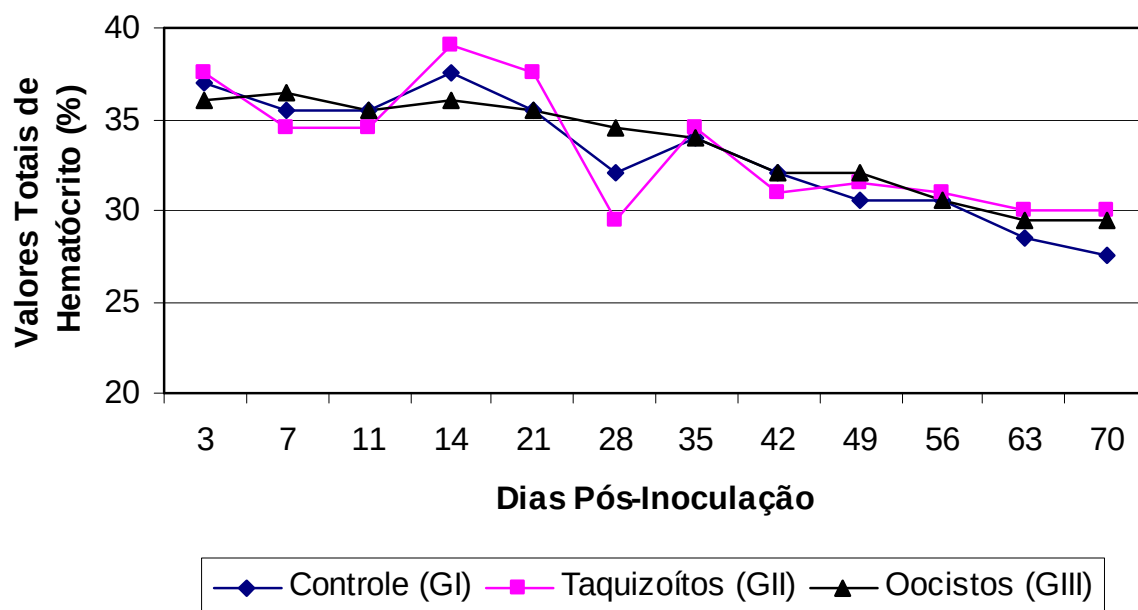


Figura 6. Média de valores de hematócrito (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

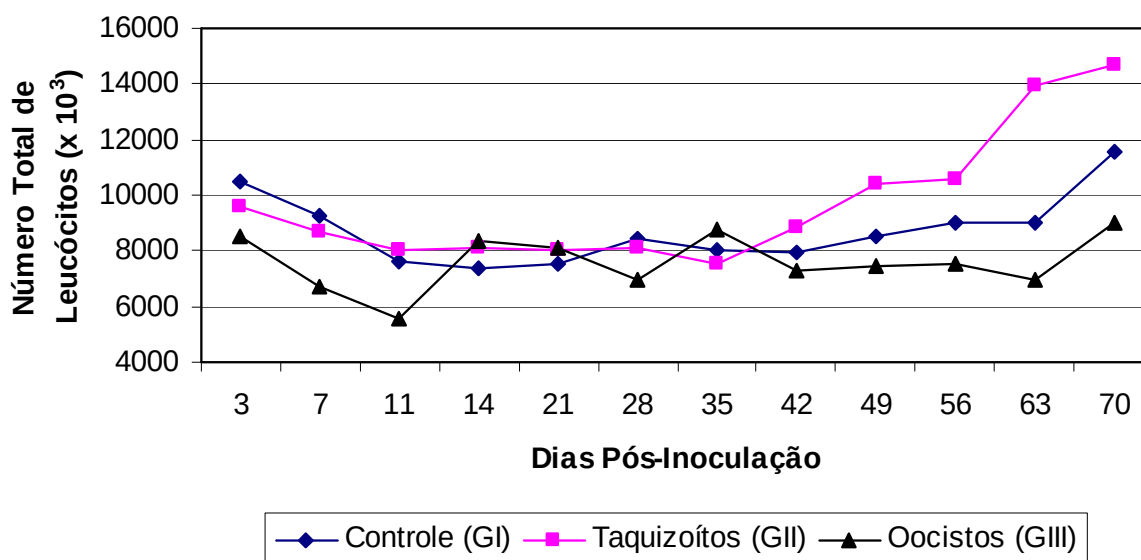


Figura 7. Média de valores de leucócitos ($n \times 10^3/\mu\text{L}$) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

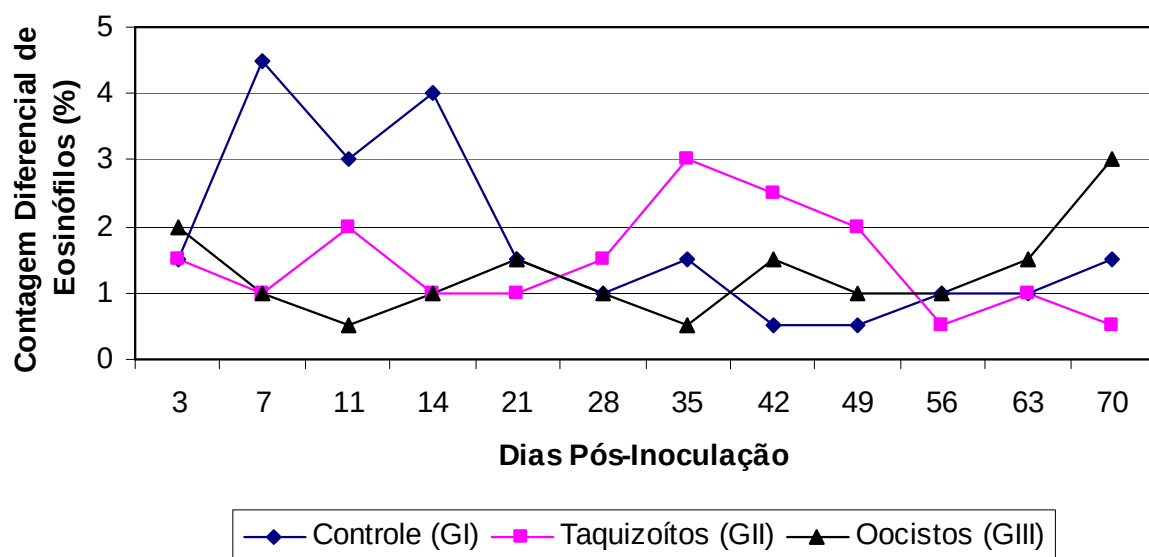


Figura 8. Média de valores de eosinófilos (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

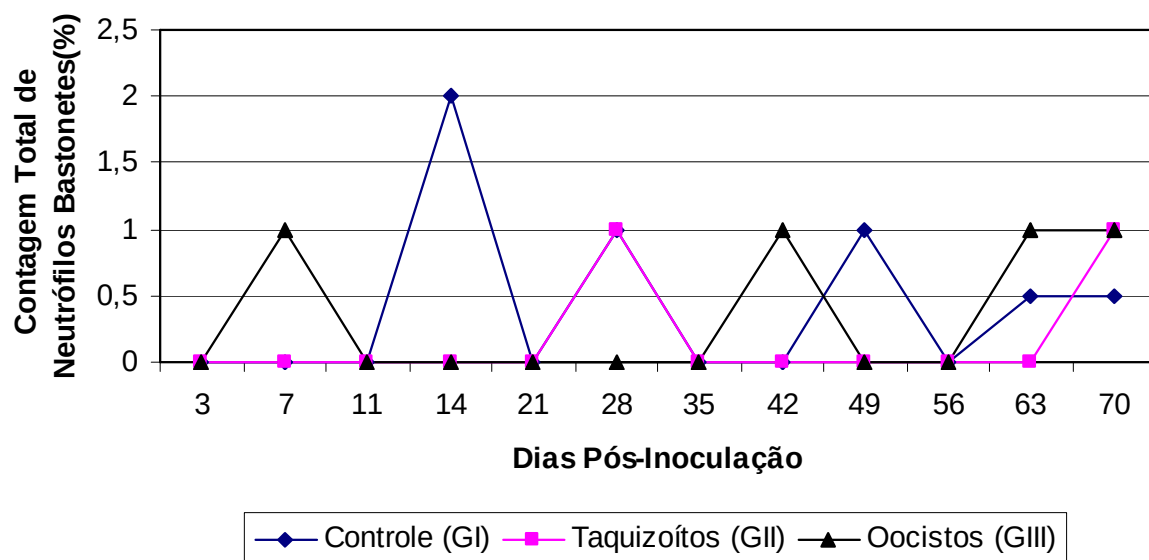


Figura 9. Média de valores de neutrófilos bastonetes (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

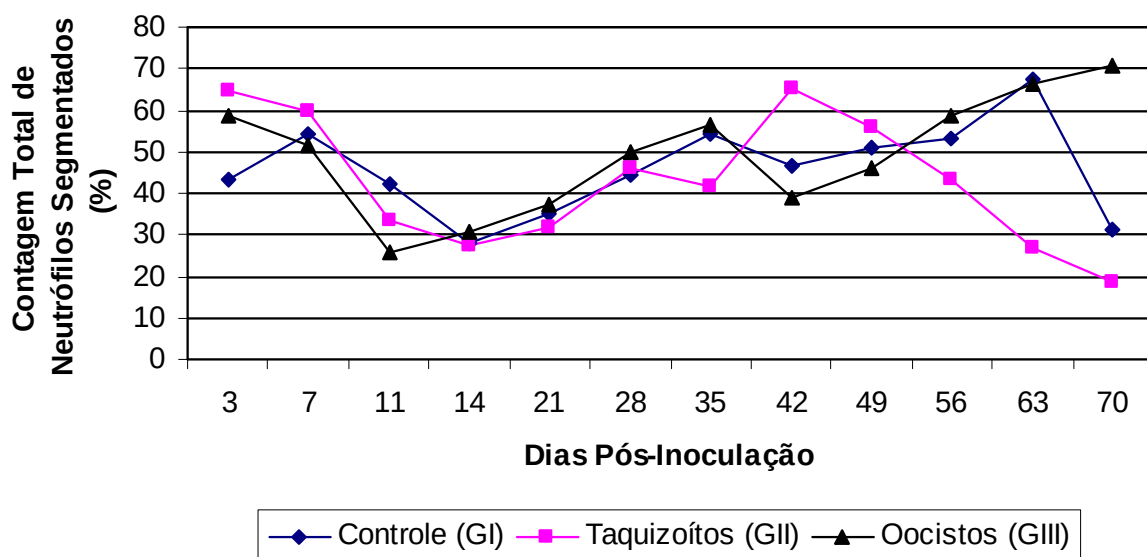


Figura 10. Média de valores de neutrófilos segmentados (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

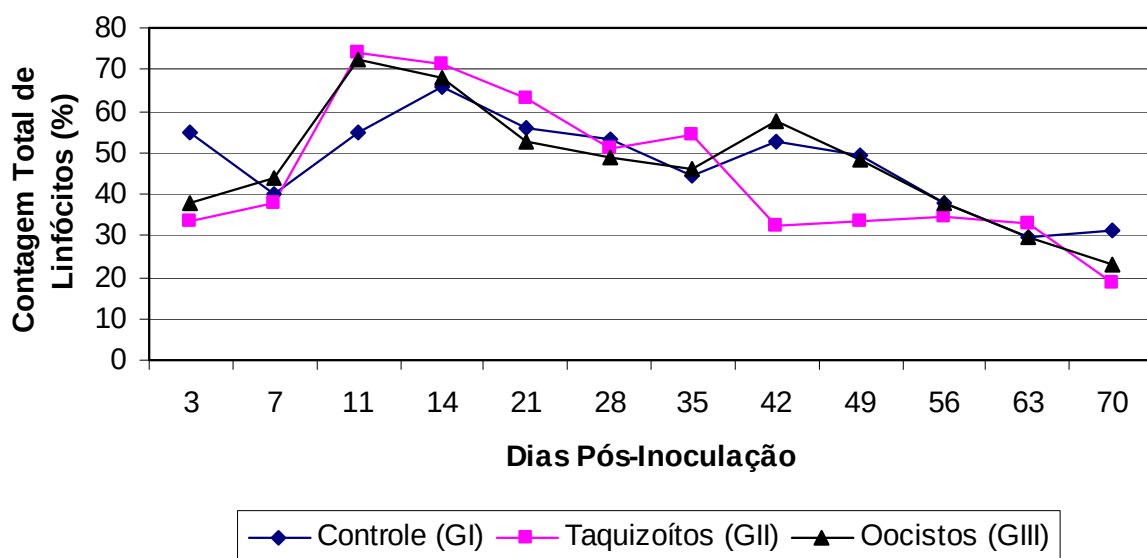


Figura 11. Média de valores de linfócitos (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

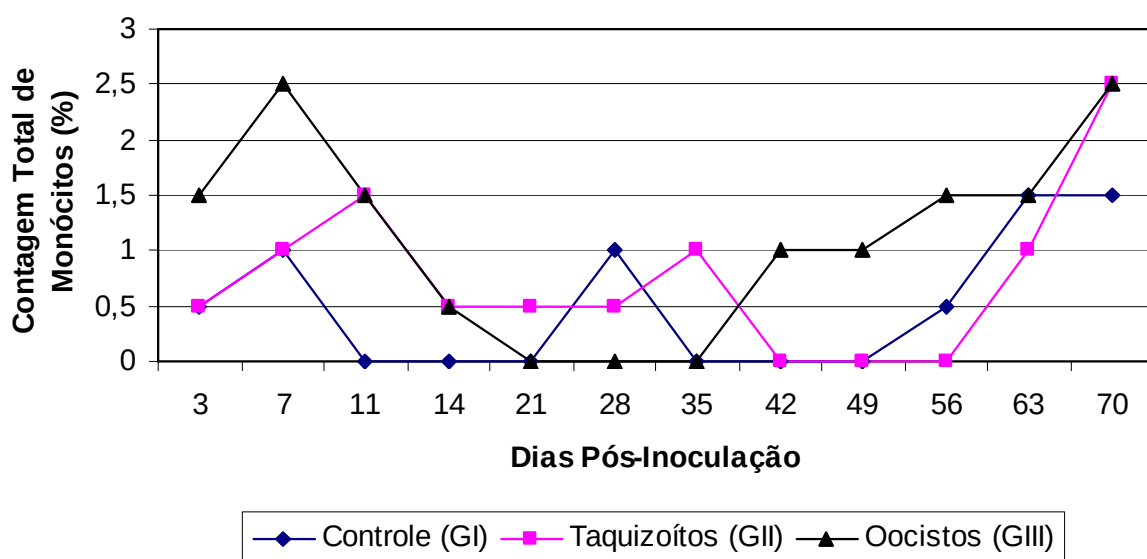


Figura 12. Média de valores de monócitos (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

4.7 - Determinação de Parasitemia

A parasitemia foi determinada, conforme descrito no item 3.7, de forma indireta, pela sorologia dos camundongos inoculados, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram títulos sorológicos $\geq 1:64$, sendo realizado também a confirmação da presença de cistos teciduais nas amostras cerebrais dos respectivos camundongos. Desta forma, surtos parasitêmicos foram detectados nos caprinos inoculados com taquizoítos, nos dias 11, 14, 28, 49, 56, 63 e 70 DPI. Naqueles que receberam oocistos, parasitemia foi diagnosticada nos dias 14, 21, 56 e 70 pós-inoculação (Tabela 16).

Tabela 16. Parasitemia em Caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Nº dos caprinos	Inóculo	Parasitemia (dias pós-inoculação)														Total
		-2	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
32	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Taquizoítos	-	-	-	-	-	Ps	-	Ps	-	-	-	-	Ps	-	3
11		-	-	-	-	Ps	Ps	-	-	-	-	Ps	Ps	-	Ps	5
Total			0	0	0	1	2	0	1	0	0	1	1	1	1	8
36	Oocistos	-	-	-	-	-	Ps	-	-	-	-	-	Ps	-	Ps	3
47		-	-	-	-	-	Ps	Ps	-	-	-	-	-	-	-	2
Total		0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	1	5

Ps - RIFI para *Toxoplasma gondii* positiva ($\geq 1 : 64$) em camundongos inoculados - Confirmação pela presença de cistos nos encéfalos dos camundongos inoculados

4.8 - Resposta Imune Humoral (RIFI)

As recíprocas dos títulos obtidos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI (CAMARGO, 1964) estão expressas na Tabela 17.

Observou-se a soroconversão (título $\geq 1:64$) a partir do 11º DPI em ambos os grupos inoculados, sendo a diluição 1:4096 o título sorológico máximo verificado nos 14º, 21º e 28º DPI para o grupo de animais inoculados com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos e nos 21º e 28º DPI para o grupo de animais inoculados com 2×10^5 oocistos. Embora tenham ocorrido variações nos títulos de anticorpos nos animais que receberam *T. gondii* durante o decorrer do experimento, tornou-se visível um decréscimo deste título a partir do 28º DPI para todos os animais inoculados com *T. gondii*.

Os animais do grupo controle não apresentaram anticorpos contra o parasita em nenhum momento experimental.

Tabela 17. Recíproca dos títulos obtidos pela Reação de Inumofluorescência Indireta (RIFI) nos soros de caprinos não inoculado (controle) e inoculados com $1,0 \times 10^6$ de taquizoítos e $2,0 \times 10^5$ de oocisto de *Toxoplasma gondii*.

Dia Pós-inoculação	Recíproca dos títulos sorológicos					
	Nº caprino / controle		Nº caprino / taquizoítos		Nº cap rino / oocistos	
	32	41	1	11	36	47
-2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
11	-	-	256	1024	-	256
14	-	-	4096	256	256	256
21	-	-	4096	4096	4096	4096
28	-	-	4096	4096	4096	4096
35	-	-	1024	1024	1024	1024
42	-	-	1024	1024	1024	1024
49	-	-	1024	1024	1024	1024
56	-	-	1024	1024	64	1024
63	-	-	1024	1024	1024	1024
70	-	-	1024	1024	1024	1024

4.9 Exame do sistema reprodutor dos caprinos

4.9.1 Parâmetros espermáticos:

Os valores espermáticos médios, referentes às 84 amostras de sêmen colhidas encontram-se sumariados nas tabelas 18 a 20 e ilustrados nas figuras 13 a 17.

Tabela 18. Valores espermáticos médios obtidos de caprinos não inoculados (grupo controle).

Datas experimentais	Valores espermáticos médios				
	Volume (mL)	Motil. (%)	Vig. (0-5)	Patol. (%)	Concentração (sptz/mL)
-2	0,65	25	3	1,5	10×10^8
3	0,75	25	2	1	$36,5 \times 10^8$
5	0,75	30	1,5	5	$4,35 \times 10^8$
7	0,75	37	2	3,5	$27,5 \times 10^8$
11	1,3	67	3,5	3,5	$74,5 \times 10^8$
14	1,5	65	4	2	$41,5 \times 10^8$
21	1,4	80	3,5	2	$34,5 \times 10^8$
28	1,1	47	3	1,5	$23,5 \times 10^8$
35	0,6	30	1	7	45×10^8
42	0,7	30	1	2	20×10^8
49	1,3	12	1,5	3,5	$17,5 \times 10^8$
56	0,8	0	0	0	13×10^8
63	0,9	30	1,5	1,5	$24,5 \times 10^8$
70	1,25	3	0	5	$19,5 \times 10^8$

Tabela 19. Valores espermáticos médios obtidos de caprinos inoculados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Datas experimentais	Valores espermáticos médios				
	Volume (mL)	Motil. (%)	Vig. (0-5)	Patol. (%)	Concentração (sptz/mL)
-2	1,0	70	3,5	5	68,63x10 ⁸
3	1,25	45	4	2	47x10 ⁸
5	1,6	57	4	4,5	151,2x10 ⁸
7	1,95	60	2,5	8	47,1x10 ⁸
11	1,2	70	3,5	2	106x10 ⁸
14	1,7	60	4	1,5	47x10 ⁸
21	2,0	75	3	1	35,75x10 ⁸
28	1,8	80	1,5	2,5	32,3x10 ⁸
35	1,8	37	2,5	5,5	44,7x10 ⁸
42	1,5	80	2	3	22x10 ⁸
49	1,9	32	0,5	4,5	37,8x10 ⁸
56	1,3	40	2,5	2	1,2x10 ⁸
63	1,7	55	3	1	27,5x10 ⁸
70	2,5	40	3	5	5,7x10 ⁸

Tabela 20. Valores espermáticos médios obtidos de inoculados com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii*.

Datas experimentais	Valores espermáticos médios				
	Volume (mL)	Motil. (%)	Vig. (0-5)	Patol. (%)	Concentração (sptz/mL)
-2	1,7	70	3,5	8,5	27,34x10 ⁸
3	1,4	85	4	0,5	32,2x10 ⁸
5	2	80	4	3	76,35x10 ⁸
7	2,35	55	2,5	3,5	67,35x10 ⁸
11	2	72	3,5	1,5	96,75x10 ⁸
14	1,9	75	4	1,5	65,75x10 ⁸
21	1,9	55	3	4	65,5x10 ⁸
28	2,2	35	1,5	38	79x10 ⁸
35	1,3	45	2,5	9	35,5x10 ⁸
42	1,1	60	2	6	42,8x10 ⁸
49	2,4	12	0,5	5	53x10 ⁸
56	1,3	42	2,5	6	32,3x10 ⁸
63	1,7	75	3	4,5	44,2x10 ⁸
70	1,8	65	3	10	67,9x10 ⁸

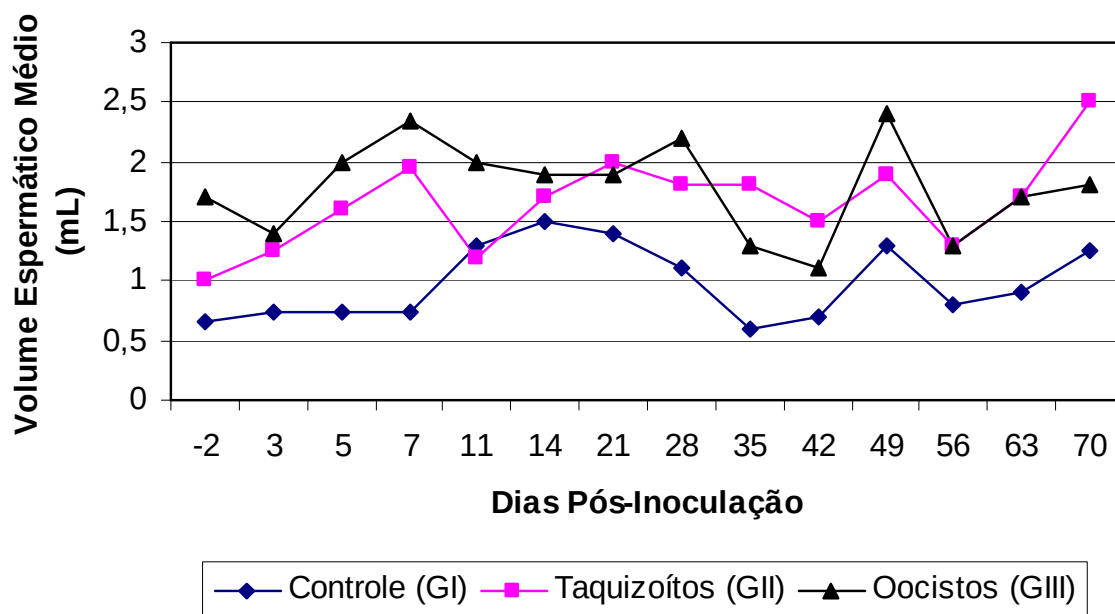


Figura 13. Volume espermático médio (mL) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

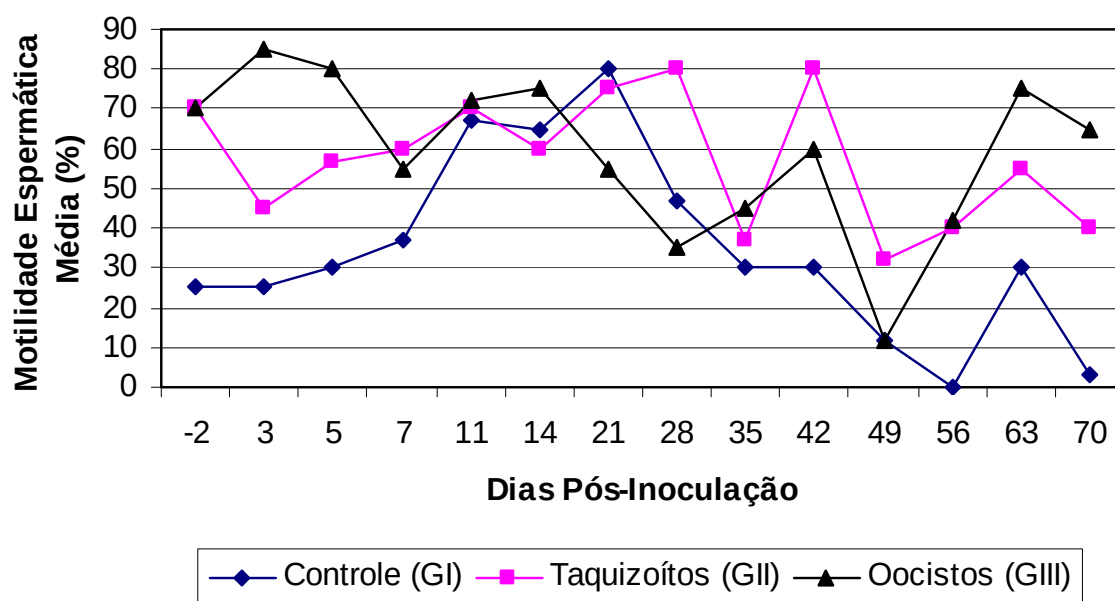


Figura 14. Motilidade espermática média (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

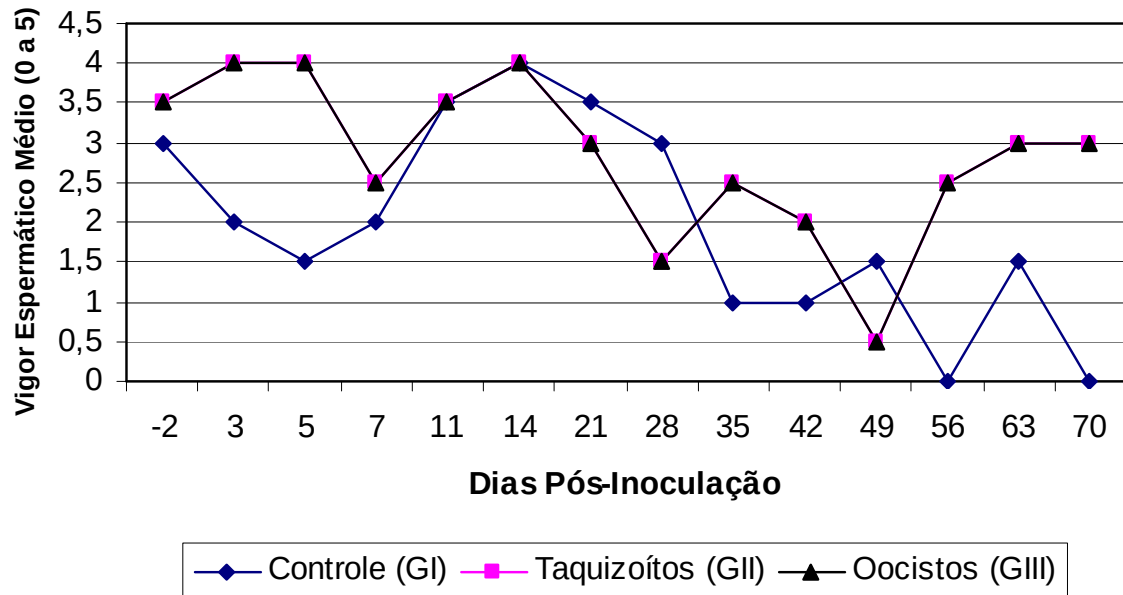


Figura 15. Vigor espermático médio (0 a 5) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

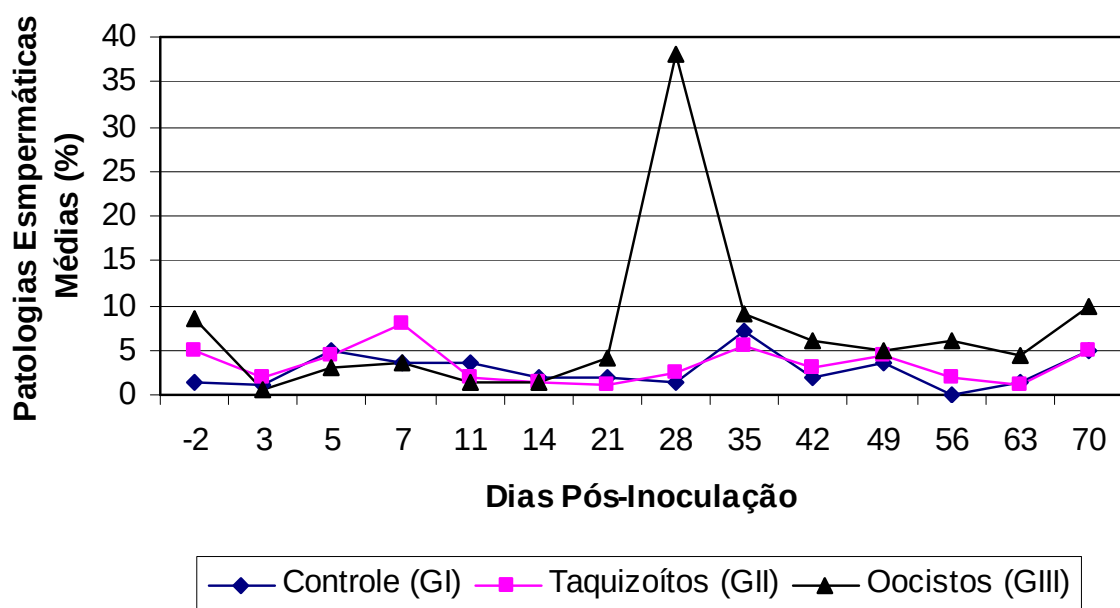


Figura 16. Patologias espermáticas médias (%) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

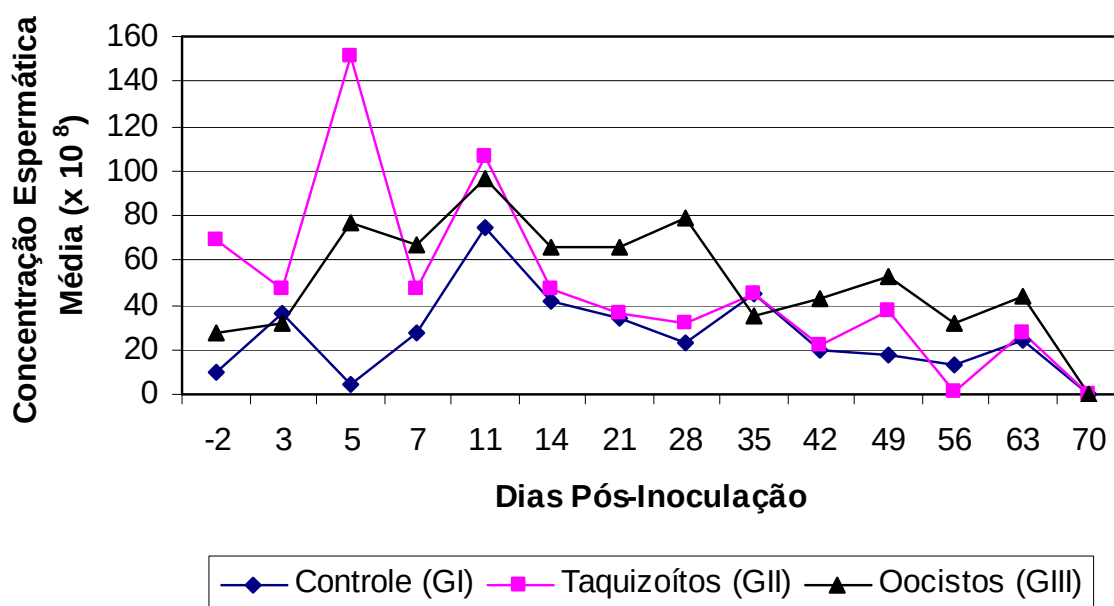


Figura 17. Concentração espermáticas médias ($\times 10^8$) em caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

4.9.2 Isolamento de *T. gondii* em amostras seminais (Bioprova)

Em todas amostras de sêmen colhidas foi pesquisada a presença de *T. gondii*, conforme metodologia proposta por TEALE et al. (1982).

Nas amostras seminais colhidas dos caprinos inoculados com 1×10^6 taquizoítos detectou-se a presença de *T. gondii* nos dias 5, 7, 28, 49, 63 e 70 pós-inoculação por meio da viragem sorológica nos camundongos inoculados. Naquelas colhidas dos caprinos inoculados com oocistos, *T. gondii* pode ser isolado apenas no 56° e 70° dia pós-inoculação (Tabela 21). Nas amostras positivas pela bioprova foi feita a pesquisa para a confirmação de cistos cerebrais nos camundongos correspondentes.

Tabela 21. Presença de *Toxoplasma gondii* em ejaculados de sêmen de caprinos não inoculados (controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos (técnica da Bio-prova)

Nº dos caprinos	Inóculo	<i>T. gondii</i> (dias pós-inoculação)														Total
		-2	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
32	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Taquizoítos	-	-	-	Ps	-	-	-	Ps	-	-	Ps	-	Ps	Ps	5
11		-	-	Ps	-	-	-	-	Ps	-	-	-	-	Ps	-	3
Total		0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	1	0	2	1	8
36	Oocistos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ps	-	-	1
47		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ps	-	Ps	2
Total		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	3

Ps - RIFI para Toxoplasmose positiva ($\geq 1 : 64$) em camundongos inoculados - Confirmação pela presença de cistos nos encéfalos dos camundongos inoculados

4.9.3 Pesquisa de DNA de *T. gondii* no sêmen dos caprins pela PCR

Das amostras seminais positivas na bioprova foi pesquisada a presença de material genético de *T. gondii* pela técnica da PCR sendo os resultados registrados na Figura 18, que apresenta ainda os resultados referentes à pesquisa do parasita pela mesma técnica em tecidos do sistema reprodutor (item 4.11.2). Como se pode observar foi detectado material genético do parasita nos 5º, 7º, 28º, 49º e 70º DPI em algumas amostras seminais do grupo de animais inoculados com taquizoítos, e no 56º DPI nas amostras seminais dos dois animais pertencentes ao grupo inoculado com oocistos.

4.10 Exames anátomo-histopatológicos dos reprodutores

Nas amostras teciduais (testículo, epidídimo, próstata e vesícula seminal) dos caprinos inoculados com *T. gondii* e dos não inoculados (controle), não foram observadas lesões anatomopatológicas.

4.11 Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos dos caprinos (sistema reprodutor)

4.11.1 – Bioprova

Macerados teciduais de testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal dos reprodutores foram preparados e inoculados, por via intraperitoneal, em camundongos, conforme técnica descrita por DUBEY (1980). Após quarenta dias foi realizada a sorologia (RIFI) dos camundongos. Foram detectadas sorologias positivas (RIFI $\geq$ 1: 64) para o animal nº 11 referente ao grupo de caprinos inoculados com 1×10^6 taquizoítos e para o reprodutor nº 36 referente ao grupo de animais inoculados com 2×10^5 oocistos. Também foi realizada a confirmação pela pesquisa de cistos nas amostras cerebrais dos camundongos inoculados (CAMARGO, 1964).

4.11.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Figura 18 ilustra a presença / ausência do DNA de *T. gondii* nas amostras seminais (item 4.9.3) assim como no “pool” de tecidos (testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata) de cada animal. Nas amostras teciduais analisadas, somente nos caprinos 36 (inoculado com oocistos) e 11 (inoculado com taquizoítos) foi verificada a presença de *T. gondii* por meio da técnica de PCR.

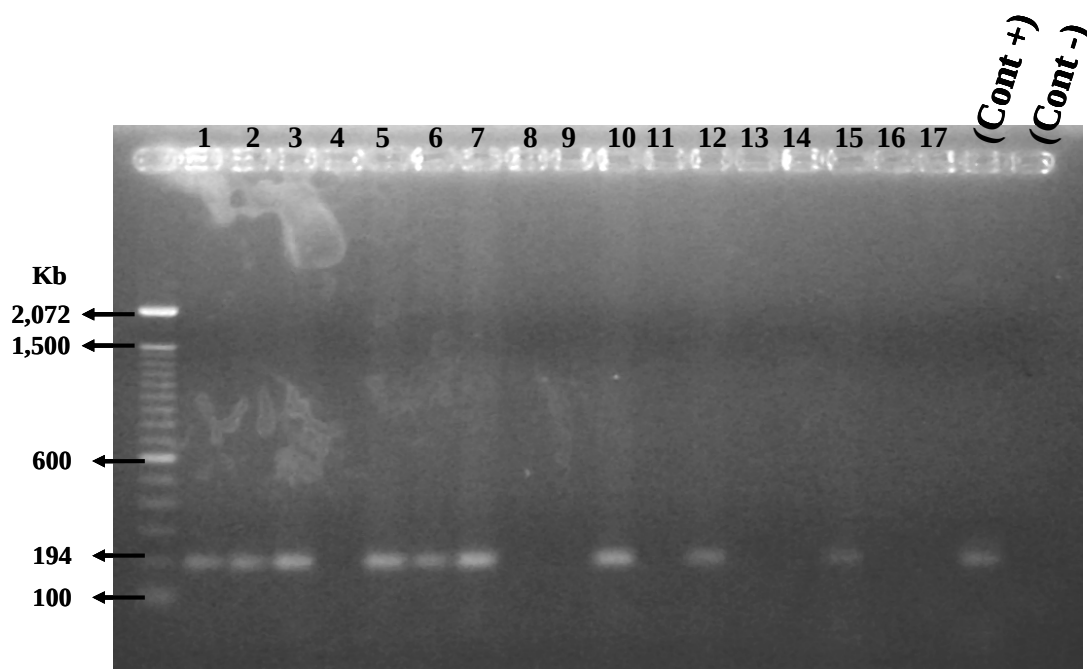


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir das amostras seminais (amostras de 1 a 11) e do “pool” das amostras de tecidos (testículos, vesícula seminal, próstata e epidídimos – amostras de 12 a 17) dos caprinos experimentalmente infectados. (1) Sêmen do caprino 11 (5 dias pós-inoculação). (2) Sêmen do caprino 01 (7 dias pós-inoculação). (3) Sêmen do caprino 01 (28 dias pós-inoculação). (4) Sêmen do caprino 11 (28 dias pós-inoculação). (5) Sêmen do caprino 01 (49 dias pós-inoculação). (6) Sêmen do caprino 36 (56 dias pós-inoculação). (7) Sêmen do caprino 47 (56 dias pós-inoculação). (8) Sêmen do caprino 01 (63 dias pós-inoculação). (9) Sêmen do caprino 11 (63 dias pós-inoculação). (10) Sêmen do caprino 01 (70 dias pós-inoculação). (11) Sêmen do caprino 47 (70 dias pós-inoculação). (12) Caprino 36 (inoculado com oocistos). (13) Caprino 47 (inoculado com oocistos). (14) Caprino 01 (inoculado com taquizoítos). (15) Caprino 11 (inoculado com taquizoítos). (16) Caprino 32 (controle). (17) Caprino 41 (controle).

4.11.3 – Imunohistoquímica

Foi detectada imunorreatividade ao *T. gondii* nas amostras teciduais de epidídimo dos dois animais inoculados com 1×10^6 taquizoítos (Figura 19) quanto nos outros dois inoculados com 2×10^5 oocistos (Figura 20).

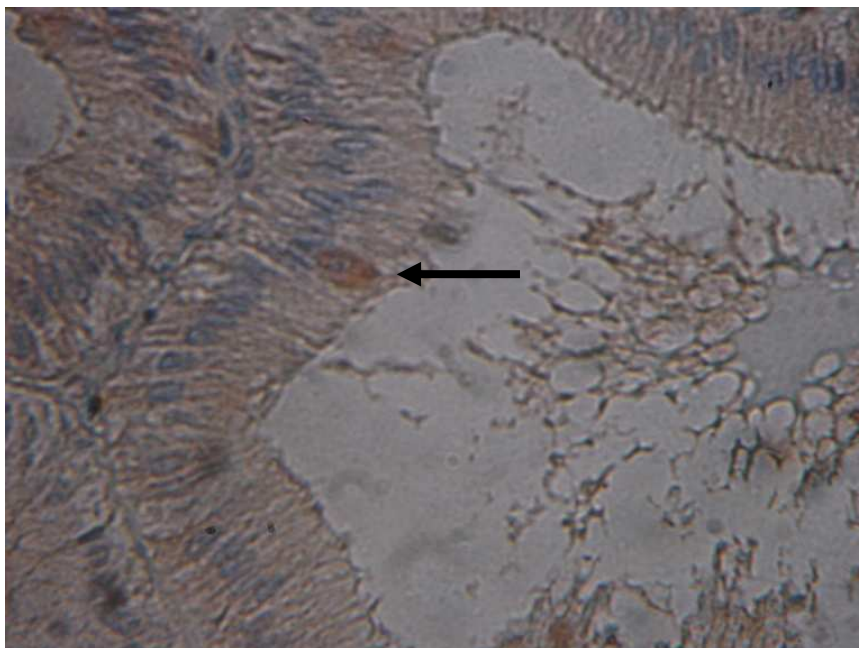


Figura 19. Fotomicrografia de epidídimo de caprino inoculado com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (animal 01) com imunomarcção positiva para *Toxoplasma gondii* (seta). Aumento de 400x .

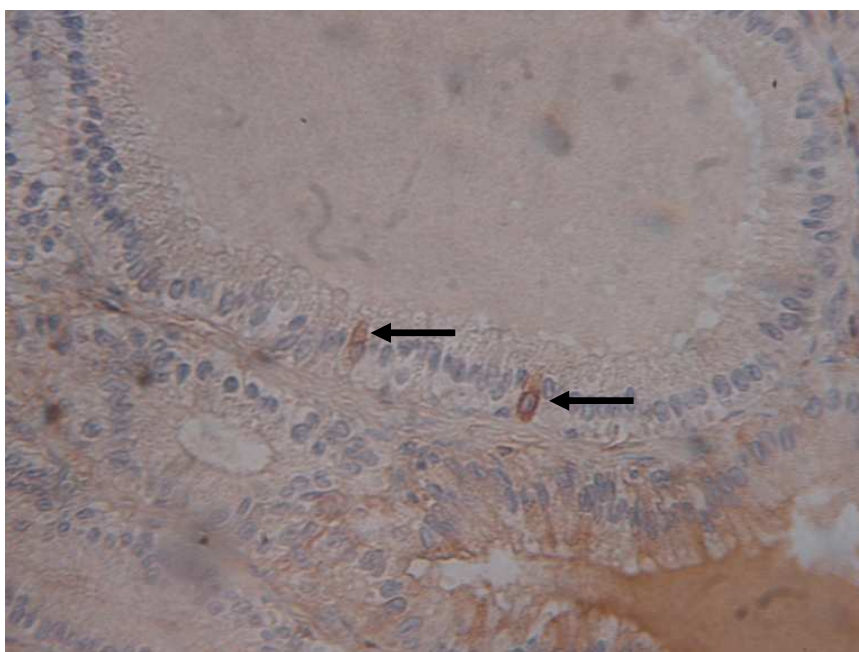


Figura 20. Fotomicrografia de epidídimo de caprino inoculado com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii* (animal 36) com imunomarcção positiva para *Toxoplasma gondii* (seta). Aumento de 400x .

4.12. Análise estatística

Os resultados da análise estatística referentes aos parâmetros clínicos e hematológicos estão sumariados nas Tabelas 22 a 33.

Tabela 22. Análise estatística dos valores médios das temperaturas retais de caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Temperatura retal média / Dias Pós-inoculação														
	-2	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	X Geral
I (Controle)	39,6 ^{Aa}	38,6 ^{Ad}	38,1 ^{Ac}	38,9 ^{Ad}	37,2 ^{Ab}	36,9 ^{Ab}	38,1 ^{Ac}	38,6 ^{Ad}	38,6 ^{Ad}	38,6 ^{Ad}	38,2 ^A	38,3 ^{Ac}	38,8 ^{Ad}	38,9 ^{Ad}	38,4^A
II (Taquizoítos)	39,8 ^{Aa}	37,8 ^{Ab}	39,2 ^{Ba}	39,8 ^{Ba}	38,3 ^{Bb}	37,9 ^{Bb}	38,4 ^{Ab}	38,4 ^{Ab}	37,6 ^{Bb}	38,3 ^{Ab}	39,2 ^{Aa}	38,8 ^{Ab}	38,5 ^{Ab}	39,0 ^{Aa}	38,6^A
III (Oocistos)	39,9 ^{Aa}	38,5 ^{Ab}	40,7 ^{Ca}	40,3 ^{Ba}	39,1 ^{Bb}	38,4 ^{Bb}	37,6 ^{Ab}	38,7 ^{Ab}	38,8 ^{Ab}	38,8 ^{Ab}	38,8 ^{Ab}	38,6 ^{Ab}	38,7 ^{Ab}	38,7 ^{Ab}	39,0^A
X Geral	39,7^a	38,3^b	39,3^a	39,7^a	38,2^b	37,7^b	38,0^b	38,5^b	38,3^b	38,5^b	38,7^b	38,6^b	38,7^b	38,8^b	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 23. Análise estatística dos valores médios das frequências cardíacas em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Frequência cardíaca média / Dias Pós-inoculação														
	-2	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	X Geral
I (Controle)	120,0 ^{Aa}	72,0 ^{Aa}	82,0 ^{Aa}	105,0 ^{Aa}	105,0 ^{Aa}	80,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}	114,0 ^{Aa}	96,0 ^{Aa}	118,0 ^{Aa}	92,0 ^{Aa}	76,0 ^{Aa}	93,0 ^{Aa}	99,0 ^{Aa}	96,5 ^A
II (Taquizoítos)	110,0 ^{Aa}	68,0 ^{Aa}	78,0 ^{Aa}	120,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}	76,0 ^{Aa}	90,0 ^{Aa}	108,0 ^{Aa}	80,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}	114,0 ^{Aa}	126,0 ^{Ba}	112,0 ^{Aa}	112,0 ^{Aa}	99,5 ^A
III (Oocistos)	118,0 ^{Aa}	80,0 ^{Ab}	126,0 ^{Aa}	140,0 ^{Aa}	70,0 ^{Ab}	112,0 ^{Ab}	96,0 ^{Ab}	96,0 ^{Ab}	97,5 ^{Ab}	160,0 ^{Ba}	94,0 ^{Ab}	73,0 ^{Ab}	106,0 ^{Ab}	118,0 ^{Ab}	106,1 ^A
X Geral	116,0 ^a	73,3 ^b	95,3 ^b	121,7 ^a	91,7 ^b	89,3 ^b	95,3 ^b	106,0 ^a	91,2 ^b	126,0 ^a	100,0 ^b	91,7 ^b	103,7 ^a	109,7 ^a	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 24. Análise estatística dos valores médios das frequências respiratórias em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Frequência respiratória média / Dias Pós-inoculação														
	-2	3	5	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	X Geral
I (Controle)	24,0 ^{Aa}	16,0 ^{Aa}	16,0 ^{Aa}	26,0 ^{Aa}	22,0 ^{Aa}	24,0 ^{Aa}	26,0 ^{Aa}	24,0 ^{Aa}	14,0 ^{Aa}	20,0 ^{Aa}	26,0 ^{Aa}	16,0 ^{Aa}	18,0 ^{Aa}	24,0 ^{Aa}	21,1^A
II (Taquizoítos)	54,0 ^{Aa}	22,0 ^{Ab}	26,0 ^{Ab}	22,0 ^{Ab}	24,0 ^{Ab}	20,0 ^{Ab}	24,0 ^{Ab}	24,0 ^{Ab}	18,0 ^{Ab}	22,0 ^{Ab}	28,0 ^{Ab}	20,0 ^{Ab}	22,0 ^{Ab}	21,0 ^{Aa}	24,7^A
III (Oocistos)	28,0 ^A	20,0 ^A	36,0 ^A	28,0 ^A	22,0 ^A	22,0 ^A	22,0 ^A	22,0 ^A	17,0 ^A	24,0 ^A	30,0 ^A	14,0 ^A	18,0 ^A	20,0 ^A	23,0^A
X Geral	35,3^a	19,3^b	26,0^b	25,3^b	22,6^b	22,0^b	24,0^b	23,3^b	16,3^b	22,0^b	28,0^b	16,6^b	19,3^b	21,6^b	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 25. Análise estatística dos valores médios das contagens de hemácias ($n \times 10^6$)/ μL em caprinos não Inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios das contagens de hemácias (n x 10 ⁶) / Dias Pós-inoculação												
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	X Geral
I (Controle)	16800,0 ^{Aa}	16500,0 ^{Aa}	16130,0 ^{Aa}	17010,5 ^{Aa}	16525,0 ^{Aa}	16600,0 ^{Aa}	18350,0 ^{Aa}	16000,0 ^{Aa}	17040,0 ^{Aa}	19195,0 ^{Aa}	26850,0 ^{Bb}	17350,0 ^{Aa}	17862,5 ^A
II (Taquizoítos)	18300,0 ^{Aa}	17900,0 ^{Aa}	15385,0 ^{Aa}	15662,0 ^{Aa}	14790,0 ^{Aa}	13575,0 ^{Aa}	13750,0 ^{Aa}	15475,0 ^{Aa}	16320,0 ^{Aa}	16570,0 ^{Aa}	17190,0 ^{Aa}	17900,0 ^{Aa}	16068,0 ^A
III (Oocistos)	17250,0 ^{Aa}	17300,0 ^{Aa}	16295,0 ^{Aa}	16161,0 ^{Aa}	16945,0 ^{Aa}	19475,0 ^{Aa}	17427,5 ^{Aa}	16675,0 ^{Aa}	16920,0 ^{Aa}	18227,5 ^{Aa}	29400,0 ^{Bb}	17300,0 ^{Aa}	18281,3 ^A
X Geral	17450,0 ^a	17233,3 ^a	15936,7 ^a	16277,8 ^a	16086,7 ^a	16550,0 ^a	16509,2 ^a	16050,0 ^a	16760,0 ^a	17997,5 ^a	24480,0 ^b	17516,7 ^a	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 26. Análise estatística dos valores médios de hemoglobina (g/dL) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios das concentração de hemoglobina (g/dL) / Dias Pós-inoculação												
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	X Geral
I (Controle)	13,1 ^{Aa}	12,5 ^{Aa}	12,2 ^{Aa}	13,1 ^{Aa}	13,0 ^{Aa}	13,0 ^{Aa}	14,4 ^{Aa}	12,2 ^{Aa}	11,8 ^{Ab}	11,4 ^{Ab}	10,8 ^{Ab}	10,0 ^{Ab}	12,3 ^A
II (Taquizoítos)	14,1 ^{Aa}	13,1 ^{Aa}	11,8 ^{Ab}	12,1 ^{Ab}	11,1 ^{Ab}	12,4 ^{Ab}	14,0 ^{Aa}	11,0 ^{Ac}	10,9 ^{Ac}	10,4 ^{Ac}	10,0 ^{Ac}	9,6 ^{Ac}	11,7 ^A
III (Oocistos)	13,3 ^{Aa}	13,0 ^{Aa}	12,5 ^{Ab}	12,3 ^{Ab}	13,0 ^{Aa}	13,8 ^{Aa}	14,1 ^{Aa}	12,2 ^{Ab}	12,5 ^{Ab}	11,9 ^{Ab}	11,2 ^{Ab}	10,8 ^{Ab}	12,5 ^A
X Geral	13,5 ^d	12,9 ^c	12,2 ^c	12,5 ^c	12,4 ^c	13,1 ^c	14,2 ^d	11,8 ^b	11,7 ^b	11,3 ^b	10,7 ^a	10,1 ^a	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 27. Análise estatística dos valores médios de hematócrito (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios de hematócrito(%) / Dias Pós-inoculação												X Geral
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
I (Controle)	37,0 ^{Aa}	35,5 ^{Aa}	35,5 ^{Aa}	37,5 ^{Aa}	35,5 ^{Aa}	32,0 ^{Ab}	34,0 ^{Aa}	32,0 ^{Ab}	30,5 ^{Ab}	30,5 ^{Ab}	28,5 ^{Ab}	27,5 ^{Ab}	33,0 ^A
II (Taquizoítos)	37,5 ^{Aa}	34,5 ^{Aa}	34,5 ^{Aa}	39,0 ^{Aa}	37,5 ^{Aa}	29,5 ^{Ab}	34,5 ^{Aa}	31,0 ^{Ab}	31,5 ^{Ab}	31,0 ^{Ab}	30,0 ^{Ab}	30,0 ^{Ab}	33,4 ^A
III (Oocistos)	36,0 ^{Aa}	36,5 ^{Aa}	35,5 ^{Aa}	36,0 ^{Aa}	35,5 ^{Aa}	34,5 ^{Aa}	34,0 ^{Aa}	32,0 ^{Ab}	32,0 ^{Ab}	30,5 ^{Ab}	29,5 ^{Ab}	29,5 ^{Ab}	33,5 ^A
X Geral	36,8 ^a	35,5 ^a	35,2 ^a	37,5 ^a	36,2 ^a	32,0 ^b	34,2 ^a	31,7 ^b	31,3 ^b	30,7 ^b	29,3 ^b	29,0 ^b	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p>0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p>0,05$)

Tabela 28. Análise estatística dos valores médios das contagens totais de leucócitos ($n \times 10^3/\mu\text{L}$) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios da contagem total de leucócitos ($n \times 10^3/\mu\text{L}$) / Dias Pós-inoculação												X Geral
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
I (Controle)	10500,0 ^{Aa}	9250,0 ^{Aa}	7650,0 ^{Aa}	7350,0 ^{Aa}	7550,0 ^{Aa}	8475,0 ^{Aa}	8000,0 ^{Aa}	7950,0 ^{Aa}	8530,0 ^{Aa}	9030,0 ^{Aa}	9025,0 ^{Aa}	11550,0 ^{Aa}	8738,33 ^A
II (Taquizoítos)	9600,0 ^{Aa}	8650,0 ^{Aa}	8025,0 ^{Aa}	8100,0 ^{Aa}	8035,0 ^{Aa}	8075,0 ^{Aa}	7500,0 ^{Aa}	8850,0 ^{Aa}	10395,0 ^{Aa}	10550,0 ^{Aa}	13920,0 ^{Bb}	14700,0 ^{Bb}	9700,0 ^A
III (Oocistos)	8500,0 ^{Aa}	6750,0 ^{Aa}	5600,0 ^{Aa}	8360,0 ^{Aa}	8075,0 ^{Aa}	6950,0 ^{Aa}	8775,0 ^{Aa}	7300,0 ^{Aa}	7480,0 ^{Aa}	7500,0 ^{Aa}	7000,0 ^{Aa}	9050,0 ^{Aa}	7611,6 ^A
X Geral	9533,3 ^a	8216,7 ^b	7091,7 ^b	7936,7 ^b	7886,7 ^b	7833,3 ^b	8091,7 ^b	8033,3 ^b	8801,7 ^b	9026,7 ^b	9981,7 ^a	11766,7 ^c	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 29. Análise estatística dos valores médios das contagens diferenciais de eosinófilos (%) em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios da contagem diferencial de eosinófilos(%) / Dias Pós-inoculação												X Geral
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
I (Controle)	1,5 ^{Aa}	4,5 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	4,0 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	1,8^A
II (Taquizoítos)	1,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	2,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	2,5 ^{Aa}	2,0 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	1,5^A
III (Oocistos)	2,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	1,3^A
X Geral	1,7^a	2,2^a	1,8^a	2,0^a	1,3^a	1,2^a	1,7^a	1,5^a	1,2^a	0,8^a	1,2^a	1,7^a	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 30. Análise estatística dos valores médios das contagens de neutrófilos bastonetes em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios da contagem de neutrófilos bastonete(%) / Dias Pós-inoculação												
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	X Geral
I (Controle)	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	2,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	0,4 ^A
II (Taquizoítos)	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Ba}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,2 ^A
III (Oocistos)	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Ba}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,3 ^A
X Geral	0,0 ^a	0,3 ^a	0,0 ^a	0,7 ^a	0,0 ^a	0,7 ^a	0,0 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,0 ^a	0,5 ^a	0,8 ^a	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 31. Análise estatística dos valores médios das contagens de neutrófilos segmentados em caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios da contagem de neutrófilos segmentados(%) / Dias Pós-inoculação												
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	X Geral
I (Controle)	43,5 ^{Aa}	54,5 ^{Ab}	42,0 ^{Aa}	28,0 ^{Aa}	35,0 ^{Aa}	44,5 ^{Aa}	54,0 ^{Ab}	46,5 ^{Aa}	51,0 ^{Ab}	53,0 ^{Ab}	67,5 ^{Ab}	31,0 ^{Aa}	45,87^A
II (Taquizoítos)	64,5 ^{Ba}	60,0 ^{Aa}	33,5 ^{Ab}	27,5 ^{Ab}	32,0 ^{Ab}	46,0 ^{Ab}	41,5 ^{Ab}	65,0 ^{Ba}	56,0 ^{Aa}	43,5 ^{Ab}	27,0 ^{Bb}	18,5 ^{Ab}	42,9^A
III (Oocistos)	58,5 ^{Ba}	51,5 ^{Aa}	25,5 ^{Ab}	30,5 ^{Ab}	37,5 ^{Ab}	50,0 ^{Aa}	56,5 ^{Aa}	39,0 ^{Ab}	46,0 ^{Ab}	58,5 ^{Aa}	66,5 ^{Aa}	70,5 ^{Ba}	49,2^A
X Geral	55,5^a	55,3^a	33,7^b	28,7^b	34,8^b	46,8^a	50,7^a	50,2^a	51,0^a	51,7^a	53,7^a	40,0^b	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 32. Análise estatística dos valores médios das contagens de linfócitos (%) caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios da contagem de linfócitos(%) / Dias Pós-inoculação												
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	X Geral
I (Controle)	55,0 ^{Aa}	40,0 ^{Ab}	55,0 ^{Aa}	66,0 ^{Aa}	56,0 ^{Aa}	53,0 ^{Aa}	44,5 ^{Ab}	52,5 ^{Aa}	49,5 ^{Aa}	38,5 ^{Ab}	29,5 ^{Ab}	31,0 ^{Ab}	47,5 ^A
II (Taquizoítos)	33,5 ^{Ba}	38,0 ^{Aa}	74,0 ^{Ab}	71,0 ^{Ab}	63,0 ^{Ab}	51,0 ^{Ab}	54,5 ^{Ab}	32,5 ^{Ba}	33,5 ^{Aa}	34,5 ^{Aa}	33,0 ^{Aa}	18,5 ^{Aa}	44,8 ^A
III (Oocistos)	38,0 ^{Ba}	44,0 ^{Aa}	72,5 ^{Ab}	68,0 ^{Ab}	52,5 ^{Ab}	48,5 ^{Aa}	46,0 ^{Aa}	57,5 ^{Ab}	48,0 ^{Aa}	38,0 ^{Aa}	29,5 ^{Aa}	23,0 ^{Aa}	47,1 ^A
X Geral	42,2 ^a	40,7 ^a	67,2 ^b	68,3 ^b	57,2 ^b	50,8 ^a	48,3 ^a	47,5 ^a	43,7 ^a	37,0 ^c	30,7 ^c	24,2 ^c	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Tabela 33. Análise estatística dos valores médios das contagens de monócitos (%) de caprinos não inoculados (Controle) e inoculados com 1×10^6 taquizoítos ou com 2×10^5 oocistos de *Toxoplasma gondii*.

Grupo	Valores médios da contagem de monócitos / Dias Pós-inoculação												X Geral
	3	7	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
I (Controle)	0,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	0,5^A
II (Taquizoítos)	0,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	2,5 ^{Aa}	0,8^A
III (Oocistos)	1,5 ^{Aa}	2,5 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	2,5 ^{Aa}	1,1^A
X Geral	0,8^a	1,5^b	1,0^a	0,3^a	0,2^a	0,5^a	0,3^a	0,3^a	0,3^a	0,7^a	1,3^b	2,2^b	

Valores seguidos por letras iguais e minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

Valores seguidos por letras iguais e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$)

5. DISCUSSÃO

A infecção toxoplásmica dos caprinos reprodutores utilizados nesta pesquisa, após a inoculação de taquizoítos ou oocistos de *T. gondii*, foi confirmada pela parasitemia (Tabela 16) e também pela soroconversão dos animais inoculados (Tabela 17). Hipertermia (40,65°C) no 5º DPI foi a alteração clínica mais marcante observada no grupo de animais inoculados com oocistos (Tabela 4 e Figura 1). Semelhantemente, NISHI *et al* (2001) relatam que aumento de temperatura constitui um dos sinais clínicos mais evidentes em caprinos (com até nove meses de idade) inoculados com 10⁵ oocistos de *T. gondii*, por via oral. Além da hipertermia, observaram também anorexia e letargia do 3º ao 7º DPI, em todos os animais inoculados. DUBEY & SHARMA (1980), CHHABRA *et al.* (1982) e DUBEY (1989), também observaram sintomatologias clínicas semelhantes, além do óbito de um animal (dois a três meses de vida) inoculado com oocistos de *T. gondii* (DUBEY, 1989). Pela análise estatística efetuada, observou-se (Tabela 22) ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores médios de temperaturas, no 5º, 7º, 11º, 14º e 35º DPI, dos grupos inoculados e controle. Tais valores médios, entretanto, estão dentro dos parâmetros de normalidade (SMITH; 1993).

A ausência de outras alterações clínicas, além da hipertermia, decorrentes da infecção toxoplásmica nos caprinos reprodutores da presente pesquisa, pode ser consequência da idade dos animais utilizados (acima de 12 meses). Deve-se ressaltar que os autores supracitados utilizaram animais jovens (menos de 12 meses), demonstrando, assim, que a infecção toxoplásmica é mais patogênica em jovens, além de estar relacionada à patogenicidade da cepa e a dose do inóculo utilizado (DUBEY, 1985). Outro ponto interessante a ser explorado é a ausência na literatura de trabalhos relatando parâmetros clínicos de caprinos inoculados como as cepas “P” ou mesmo com a “RH”, o que dificulta uma discussão mais aprofundada sobre o comportamento dos animais inoculados na presente pesquisa.

Embora alterações hematimétricas tenham sido verificadas em alguns dos reprodutores ao longo do experimento, não foram observadas diferenças estatísticas entre um mesmo parâmetro de diferentes grupos experimentais (Tabelas 7 a 15 e 25 a 33), o que poderia, possivelmente, justificar a ausência de alterações clínicas mais evidentes. Inexistente também é a literatura sobre parâmetros hematológicos de caprinos infectados natural ou experimentalmente por *T. gondii*, o que certamente impossibilita relacionar tais alterações hematológicas ao parasitismo. Entretanto, as alterações no número de leucócitos, influenciadas por oscilações nas contagens de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos (Tabelas 10 a 15 e 28 a 33), podem, possivelmente, ser em decorrência de uma resposta ao fator estressante (instalação do *T. gondii*) no organismo animal. Vale frisar que, em decorrência de um estímulo estressante, o sistema neuro-endócrino é ativado, o que leva à liberação de cortisol pela glândula supra-renal, gerando uma diminuição dos glóbulos brancos quantitativamente mais expressivos, como também os neutrófilos e eosinófilos. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por COSTA (1982) e VIDOTTO *et al.* (1987) em suínos experimentalmente infectados. No entanto, apesar de ter sido notada uma variação de alguns destes parâmetros, hematológicos, os mesmos enquadram-se, dentro dos parâmetros de normalidade, segundo SMITH (1993).

A detecção do *T. gondii* na corrente sanguínea (parasitemia) dos caprinos experimentais foi verificada de forma indireta, por meio da soroconversão (RIFI) dos camundongos inoculados com camadas leucocitárias, assim como pela confirmação da presença de cistos teciduais nas amostras cerebrais de tais camundongos. Foram observados 13 surtos parasitêmicos ao longo do período experimental, sendo um no 11º, 21º, 28º, 49º, 63º DPI, dois no 56º e 70º DPI e quatro no 14º DPI (Tabela 16). Em alguns trabalhos como os realizados por CHHABRA *et al* (1982) e NISHI *et al* (2001), os surtos parasitêmicos foram mais restritos à fase aguda da doença, ou seja, do 7º ao 14º DPI e do 5º ao 12º DPI, respectivamente. Em um outro trabalho, DUBEY *et al* (1980) observaram, em um caprino, parasitemia mais precoce (4º DPI). A elevada ocorrência de surtos parasitêmicos pode ser justificada pela elevada susceptibilidade da espécie caprina ao *T. gondii*.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é aceita para o diagnóstico e levantamento epidemiológico de infecção toxoplásmica em diversas espécies animais e também no ser humano, por ser considerada de fácil execução e alta sensibilidade (CAMARGO, 1964). Outro importante fator são os antígenos de superfície do *T. gondii* serem comuns a diferentes cepas do coccídio (ARAUJO, 2003).

Utilizando-se da RIFI, pôde-se verificar que a infecção toxoplásmica desencadeou uma resposta imunológica rápida nos caprinos, com detecção de anticorpos a partir do 11º DPI (Tabela 17). Esta precocidade na resposta humoral foi também detectada por NISHI *et al.* (2001), no 10º DPI, tanto na RIFI como no Teste de Aglutinação em Látex. CHHABRA *et al.* (1982) detectaram anticorpos circulantes em caprinos infectados com oocistos no 15º DPI, utilizando-se do teste de Hemoaglutinação Indireta. Inoculando taquizoítos de *T. gondii*, via subcutânea, VITOR *et al.* (1999) diagnosticaram anticorpos circulantes, em caprinos, já no 5º DPI, pelo ELISA teste e pela Hemoaglutinação Indireta. Portanto, diferenças no tipo de inóculo, como também na via de infecção podem influenciar a dinâmica da resposta humoral do hospedeiro (NISHI *et al.*, 2001).

A curva de IgG observada neste trabalho (Tabela 17) teve seu início a partir do 11º DPI nos caprinos 01 e 11, inoculados com taquizoítos (títulos de 1:256 e 1:1024, respectivamente) e no caprino 47, inoculado com oocistos (1:256). O pico de títulos (1:4096) foi observado no 21º e no 28º DPI, respectivamente nos animais inoculados com taquizoítos e naqueles que receberam oocistos. A partir do 35º DPI houve uma diminuição da resposta imune humoral nos caprinos inoculados, embora, na última data experimental a recíproca de títulos sorológicos ainda se mostrasse com valores significativamente elevados (1:1024) em todos os animais pertencentes aos dois grupos inoculados com *T. gondii*.

Estes resultados discordam em parte daqueles encontrados por NISHI *et al.* (2001) que detectaram picos de títulos sorológicos (RIFI) mais tardiamente (a partir do 35º DPI). Semelhantemente ao ocorrido no presente trabalho, tais autores observaram que os títulos sorológicos mantiveram-se também em níveis relativamente elevados até o 56º DPI. Esta persistência de altos níveis

sorológicos (IgG) até o 70º DPI, no presente trabalho, pode ser justificada, conforme SHIRAHATA e SHIMIZU (1974), citados por DUBEY (1986), pelo fato destes anticorpos, relacionados à infecção crônica, apresentarem a capacidade de manterem-se “ativos”, por longo período, quando comparado às imunoglobulinas da classe IgM, notadamente identificadas apenas até poucas semanas após infecção.

A avaliação espermática ou espermograma é largamente utilizada no manejo reprodutivo de diversas espécies animais e considerada de extrema importância para o monitoramento de animais reprodutores. Comparada com outras espécies animais, menor atenção tem sido dada à fisiologia da reprodução em caprinos machos (GORDON, 1997). Variações no peso testicular, produção de esperma, atividade e fertilidade têm sido estudadas por vários pesquisadores (SONHA and SINGH, 1982; GREYLING and GROBBELAAR, 1983; PANDEY *et al.*, 1985; HIBBERT *et al.*, 1986; OKERE *et al.*, 1986; CHEMINEAU *et al.*, 1987; AL-HAZAB and BASIOUNI, 1988; ROCA *et al.*, 1992a, b; AHMED *et al.*, 1997; MARTEMUCCI *et al.*, 1998; KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000; AL-GRALBAN *et al.*, 2004), entretanto, ainda falta um estudo detalhado dos aspectos reprodutivos de caprinos, principalmente no que se refere a possível influência do *T. gondii* nos resultados da avaliação espermática.

Os parâmetros seminais e a morfologia espermática podem ser influenciados por diversos fatores, tais como erro de interpretação por parte dos observadores, causas infecciosas, climatológicas, raciais e fenotípicas, além de haver também significantes variações sazonais na qualidade do sêmen de caprinos submetidos a diferentes altitudes (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Tais variações, dificultam, também, uma comparação entre os parâmetros espermáticos de caprinos encontrados na literatura pesquisada.

Possíveis justificativas para as variações observadas nos parâmetros espermáticos de um mesmo animal, ao longo do experimento podem estar relacionadas, também, às variações ambientais, tais como oscilações da temperatura, assim como as disparidades existentes entre os animais, em uma mesma data experimental, podem estar ligadas a fatores fenotípicos, uma vez que não houve uma uniformidade entre os animais quanto às raças, medidas

escroto-testiculares, desenvolvimento ponderal e consistência testicular, que são parâmetros diretamente ligados aos resultados andrológicos (MORAES *et al.*, 1981; BONGSO *et al.*, 1982; BORGHAIN *et al.*, 1983; VILAR FILHO *et al.*, 1993). Segundo HAFEZ & HAFEZ (2004) o volume de sêmen produzido por um caprino pode variar de 0,1 a 1,5 mL, sendo que a concentração alcançada pode variar de 20×10^8 a 60×10^8 (número de espermatozóites / volume de sêmen coletado). No entanto, como na presente pesquisa foi realizada a colheita do sêmen com o uso do eletro-ejaculador, há de se levar em consideração as possíveis alterações observadas em algumas amostras. Entre elas destaca-se o aumento do volume espermático e, conseqüentemente, na variação das concentrações, devido a técnica, provocando um grande estímulo à secreção de fluídos pelas glândulas acessórias, associado à uma diminuição da concentração espermática. Isto pode justificar, por exemplo, os resultados alcançados para o volume seminal médio e a concentração espermática média dos animais pertencentes ao grupo inoculado com taquizóitos (Tabela 19) no 70° DPI. No referido momento, observou-se um grande volume coletado (2,5mL), mas, em contrapartida, uma pequena concentração seminal ($5,7 \times 10^8$). Outro ponto a ser considerado é a elevada ocorrência de patologias (38%) observada no 28° DPI para o grupo de animais inoculados com oocistos esporulados (Tabela 20). Este valor, muito provavelmente, foi alcançado em virtude de uma possível falha, principalmente na manutenção da temperatura da amostra seminal colhida, haja vista que em nenhuma outra data experimental foi detectada elevada ocorrência de patologias.

Um efeito direto do *T. gondii* na espermatogênese deveria ser acompanhado de um aumento significativo da frequência de patologias, bem como de alterações relevantes nos parâmetros seminais. Entretanto, neste trabalho não foi observada nenhuma alteração espermática que pudesse ser atribuída ao parasitismo.

No primeiro relato sobre isolamento de *T.gondii* em amostras seminais encontrada na literatura (DISKO *et al.*, 1971) foi encontrado coccídio em amostras seminais de três homens portadores de infecção toxoplásmica natural, dentre 125 pacientes participantes da avaliação. Posteriormente, SPENCE *et al.* (1978), TEALE *et al.* (1982) e AGANGA *et al.* (1988)

pesquisando amostras seminais de ovinos, DUBEY e SHARMA (1980) de caprinos, SCARPELLI (2001) de bovinos, MOURA (2004) de suínos e ARANTES (2005) em cães, obtiveram resultados positivos, utilizando animais experimentalmente infectados dos quais isolaram *T. gondii* nos ejaculados colhidos.

SPENCE *et al.* (1978) inoculando quatro ovinos com *T.gondii*, isolaram o coccídio em amostras seminais no 20º DPI, em um ovi no, no 20º e 25º DPI e no 14º e 32º DPI em outros dois animais, e uma eliminação constante do protozoário, do 7º ao 32º DPI, no último ovino.

TEALE *et al* (1982), ainda em ovinos, inocularam seis animais com 2000 cistos de *T.gondii* (cepa não mencionada), via subcutânea, obtendo sucesso no isolamento do parasita supramencionado em três animais, em duas ocasiões para cada ovino, entre o 16º e 26º DPI.

Na Nigéria, AGANGA *et al* (1988) inoculando reprodutores ovinos (machos e fêmeas) com *T.gondii*, puderam recuperar o coccídio nas amostras seminais colhidas 21 dias após a inoculação em todos os animais.

O presente trabalho constitui, pela literatura compulsada, a primeira descrição de isolamento de *T.gondii* de amostras de sêmen caprino, utilizando como recursos de diagnóstico não apenas a bioprova, mas também a PCR. Essas avaliações foram aliadas aos parâmetros espermáticos, assim como à pesquisa do protozoário, ou de possíveis alterações, por ele causadas, nos tecidos do aparelho reprodutor (próstata, vesícula seminal, testículo e epidídimo) por meio da bioprova, da PCR, e de exames histopatológicos e imunohistoquímicos.

DUBEY e SHARMA (1980) demonstraram pela bioprova em camundongo, presença de *T.gondii* no sêmen de três caprinos inoculados, por via oral, com 10^4 oocistos da cepa GT-1 (isolada de caprinos). O protozoário identificado no 7º DPI, nas amostras seminais de dois animais, e no 12º DPI do terceiro caprino experimental. Nas amostras seminais de um dos animais foi possível identificar a excreção do parasita até o 59º DPI. Levando-se em conta a diferença entre as cepas estudadas, houve uma discordância entre os resultados referentes à bioprova, relatados por estes autores, em relação àqueles encontrados na presente pesquisa. Isto porque, encontrou-se o

protozoário no grupo de animais inoculados com oocistos mais tardiamente nas amostras seminais, ou seja, aos 56° e 70° DPI. Detalhe de extrema importância a ser considerado é a ocorrência de excreção de *T. gondii*, em amostras seminais, em um maior número de datas experimentais (5°, 7°, 28°, 49°, 63° e 70° DPI) para o grupo de animais inoculados com taquizoítos, o que se assemelha aos resultados obtidos por DUBEY e SHARMA (1980). Assim como estes autores, no presente trabalho também foram realizadas a pesquisa de cistos de *T. gondii* nas amostras cerebrais dos camundongos inoculados com as amostras seminais dos caprinos experimentalmente inoculados.

As amostras seminais que se apresentaram positivas na bioprova foram também avaliadas pela PCR. Por esta técnica foi possível identificar o material genético (DNA) do *T. gondii* nas amostras dos animais 01 (7°, 28°, 49° e 70° DPI) e 11 (5° DPI), inoculados com taquizoítos, assim como nas amostras seminais dos animais 36 e 47, ambos no 56° DPI, inoculados com oocistos esporulados.

As amostras seminais do 63° DPI referente ao animal 01, do 28° e 63° DPI do animal 11, e do 70° DPI referente ao caprino 47, positivas na bioprova, não se mostraram positivas para o *T. gondii* na PCR (Figura 18).

Os resultados da PCR reforçam os achados da bioprova e confirmam a técnica como importante ferramenta auxiliar no diagnóstico da infecção toxoplásmica. Especificamente no presente trabalho foi amplificado um segmento de 194 bps do gene B₁ de *T. gondii*. Embora outras seqüências do DNA de *T. gondii* também possam ser utilizadas como alvo de amplificação (P30, TGR1E ou segmento do gene 18S r RNA) pela PCR ou “nested” PCR, o gene B₁ foi escolhido por ser amplamente conservado nos vários isolados analisados e por estar presente em pelo menos 35 locus do genoma do *T. gondii* (FUENTES *et al.*, 1996). Entretanto, recentemente um fragmento do DNA de *T. gondii* de 529 bps, que se repete entre 200 a 300 vezes no genoma do parasito, o que possivelmente amplia a sensibilidade do teste, foi identificado e testado para o desenvolvimento de uma PCR com fins diagnósticos, inclusive, quantitativos. Este fragmento apresentou sensibilidade variando de idêntica a até 10 vezes mais eficiente, dependendo do tipo de material, quando comparado com os resultados da PCR empregando-se o

gene B₁ (HOMAN *et al.*, 2000). Porém o gene B₁ tem seu uso mais difundido na pesquisa do *T. gondii* a partir de diversos tecidos/fluídos.

O uso da técnica da PCR para a detecção do *T. gondii* nas amostras seminais dos caprinos inoculados, neste trabalho, foi suscitado pelo fato desta metodologia apresentar vantagens sobre os métodos tradicionais de isolamento do parasito (bioprova em camundongos ou inoculação em cultivo celular). Em tais condições foram predispontes o tempo necessário para o resultado (seis horas na PCR contra 4 dias no cultivo celular, ou o mínimo de 5 semanas, na bioprova), alta sensibilidade da PCR, que a partir de um único parasito consegue a replicação de seu DNA, possibilitando sua detecção mesmo em baixas concentrações, com até 100% de sensibilidade (CAZENAVE *et al.*, 1992). Por outro lado, AOUIZERATE *et al.* (1993) afirmam que a detecção de um único organismo é possível somente em condições ótimas. Vários relatos, entretanto, têm demonstrado uma boa correlação entre os resultados da PCR com aqueles obtidos com a inoculação em camundongos (HOMAN *et al.*, 2000).

SCARPELI (2001) infectou experimentalmente 12 bovinos (seis com 1 x 10⁶ oocistos da cepa “P” e seis com 5 x 10⁶ taquizoítos da cepa “RH” de *T. gondii*). Com isso, foi obtido sucesso no isolamento do coccídio no sêmen de todos os bovinos infectados entre o sétimo e 84° DPI (bioprova), sendo que os isolamentos foram mais freqüentes entre o 14° e 21° DPI. No entanto, a técnica da PCR nesta pesquisa não trouxe a confirmação do coccídeo nas amostras seminais.

Em amostras seminais de suínos experimentalmente infectados (oocistos e taquizoítos) com as cepas “P” e “RH”, MOURA (2004) isolou *T. gondii* no 3°, 49° e 56° DPI de um suíno inoculado com oocisto; no 5° e 49° DPI de outro animal inoculado com taquizoíto e no 49° DPI de um 3° suíno inoculado com taquizoíto. Pesquisando o DNA toxoplásmico, por meio da PCR, detectou o parasito também no 84° DPI em amostras seminais de dois suínos (um inoculado com oocisto e outro inoculado com taquizoíto de *T. gondii*).

Em um trabalho mais recente em cães, (ARANTES, 2005) foi possível isolar o protozoário através da bioprova em algumas das amostras seminais do 7°, 21° e 35° DPI de dois animais inoculados com taquizoítos e no 7° DPI de

um animal inoculado com oocisto. Com o uso da PCR foi possível identificar a presença de material genético do protozoário no 7º, 21º e 35º DPI referentes ao cão 01 e 35º DPI referente ao cão 24, ambos inoculados com taquizoítos; para os animais inoculados com oocistos, a técnica da PCR não permitiu identificar o material genético do *T. gondii* em nenhuma data experimental avaliada.

A forma do parasito que possivelmente estava presente nas amostras seminais dos caprinos experimentais, deve ser a de taquizoíto, uma vez que bradizoítos encontram-se encerrados dentro de um cisto e este necessita de uma célula para se desenvolver, de tal forma que o espermatozóide parece ser muito pequeno para comportar um cisto (MOURA, 2004). A excreção de taquizoítos de *T. gondii* em amostras seminais pode ser explicada partindo-se do pressuposto de que cistos, localizados em algum local do sistema reprodutor, possam ter liberados bradizoítos. Estes por sua vez, convertem-se em taquizoítos (processo de interconversão que pode ter origem em diversos fenômenos de ordem imunológica, principalmente imunidade celular), atingindo, assim, o sêmen destes animais.

O número de amostras seminais positivas para a presença de *T. gondii*, a princípio pequeno, é compatível com trabalhos anteriores, embora realizados em espécies diferentes, conforme descrito previamente. Além disso, deve-se levar em consideração o volume seminal excretado pelos caprinos, até 2,5mL, do qual somente pequenas alíquotas foi tomada para a pesquisa do protozoário por meio das técnicas da bioprova e da PCR.

Achados necroscópicos, inclusive histopatológicos, obtidos em diversos experimentos, comprovam a existência de controvérsias no que concerne aos resultados poderem ou não ser atribuídos ao *T. gondii* (MOURA, 2004).

DUBEY (1989) após inoculação com oocistos, pela via oral em caprinos, e posterior necropsia, observou lesões típicas de enterite aguda, necrose de linfonodos mesentéricos e encefalomielite. Entretanto, em outros animais, inoculados com doses diferentes de oocistos, não foram encontrados nenhum tipo de lesões macro e/ou microscópica que pudesse ser atribuída ao coccídeo. Desta forma, alterações macro e/ou microscópicas como consequência da

indução da infecção nos caprinos não foram observadas no presente estudo, principalmente no que se refere às estruturas do aparelho reprodutor.

Outro importante resultado que contribui para ratificar a presença do *T.gondii* no sêmen dos animais experimentais, foi o da imunohistoquímica, por meio da qual detectou-se a presença de *T.gondii* em amostras de epidídimo de todos os caprinos inoculados, seja com oocistos ou com taquizoítos. Tal fato se assemelha, pelo menos em parte, àqueles resultados encontrados por MOURA (2004) em suínos, quando evidenciou o parasita, por esta mesma técnica em amostras de epidídimo para animais inoculados com oocistos ou com taquizoítos. No entanto, este também obteve resultado positivo em amostras vesícula seminal dos animais inoculados com taquizoítos da cepa “RH”. ARANTES (2005) à mesma forma, obteve resultados semelhantes em cães, sendo encontrado imunoreatividade ao *T. gondii* em amostras de testículo e epidídimo dos animais inoculados com oocistos ou taquizoítos, cepas “P” e “RH”, respectivamente. UGGLA *et al.* (1987) utilizaram, com sucesso, a mesma técnica para demonstrar a presença do *T. gondii* em tecidos como cotilédones, coração, cérebro e musculatura esquelética de fetos ovinos.

Salienta-se que além de todos os caprinos produzirem anticorpos contra *T. gondii*, de ter sido identificado a presença do protozoário no sêmen dos animais inoculados (bioprova e/ou PCR), pelos achados da imunohistoquímica, foi possível também o isolamento do parasita através de sua pesquisa nas amostras teciduais (“Pool” de tecidos: epidídimo, próstata, vesícula seminal e testículo). Com isso, pôde-se acrescentar resultados não só pela bioprova, mas também pela PCR, em dois animais, um pertencente ao grupo inoculado com taquizoítos (Caprino 11) e outro inoculado com oocistos (caprino 36) conforme apresentado nos itens 4.11.1 e 4.11.2. NISHI, *et al.* (2001) obtiveram também sucesso no isolamento do *T. gondii*, por meio da bioprova, em amostras teciduais de cérebro, linfonodos, fígado, rins, musculatura esquelética e cardíaca, não sendo observada qualquer tipo de lesão macroscópica nestes tecidos.

SREEKUMAR *et al.* (2004) também obtiveram sucesso no diagnóstico positivo de toxoplasmose, através da PCR, em aspirados de linfonodos de caprinos experimentalmente inoculados por via oral com 10^4 ou 10^5 oocistos

esporulados de *T. gondii*. No entanto, nesta pesquisa, não foi possível identificar o parasita, por esta mesma técnica, em amostras de sangue colhidas dos animais experimentais.

O fato de não ter sido encontrado material genético do *Toxoplasma gondii* em algumas amostras seminais, assim como em algumas das amostras do pool de tecidos, não descarta a possibilidade de falha no procedimento da PCR. Entretanto, resultados falsos negativos podem ser também consequência da reduzida quantidade (concentração) de material genético nas amostras avaliadas.

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 em diversos tecidos e fluídos.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, por meio do delineamento experimental proposto, puderam-se extrair as seguintes inferências:

- a) A infecção toxoplásmica dos caprinos reprodutores inoculados com oocistos ou taquizoítos foi comprovada pela produção de anticorpos contra *T. gondii* detectados pela RIFI.
- b) Hipertermia foi a alteração clínica de maior importância nos animais infectados com *Toxoplasma gondii*
- c) Os surtos parasitêmicos observados ocorreram durante as fases aguda e crônica da infecção, tanto nos animais inoculados com oocistos quanto naqueles que receberam taquizoítos.
- d) Todos os reprodutores caprinos infectados, com taquizoítos ou oocistos de *T. gondii*, responderam ao estímulo antigênico, por meio da produção de anticorpos contra *T. gondii*, detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta, sendo a recíproca de títulos sorológicos semelhante para os diferentes tipos de inóculos (oocistos ou taquizoítos).
- e) Não foi possível a alteração nos parâmetros seminais que pudesse ser atribuída ao parasitismo por *T. gondii*
- f) O isolamento de *T. gondii* no sêmen dos caprinos infectados experimentalmente associado ao parasitismo tissular deste parasito em fragmentos do sistema reprodutor, diagnosticadas por meio da bioprova, PCR e imunohistoquímica, sugerem a possibilidade da transmissão venérea deste coccídeo.

7. REFERÊNCIAS

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.

AHMED, M.M.M. ;MAKAWI, S.A. ; GADIR, A.A. Reproductive performance of Saanen bucks under tropical climate. *Small Ruminants Researchs.* 26, p.151-155, 1997

AL-GRALBAN, A.M.; TABBAA, M.J.; KRIDLI, R.T. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks (technical note). *Small Ruminants Researchs.* 53, p141-149, 2004

AL-HAZAB, A.A.; BASIOUNI, G.F. Seasonal variation in semen quality of bucks indigenous to Saudi Arabia. *Pakistan Vet. J.* 18, p 100-102, 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.

AQUIZERATE, F.; CAZENAVE, J.; POIRIER, L.; VERIN, Ph.; CHEYROU, A.; BEQUERET, J.; LAGOUTTE, F. Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humour by the polymerase chain reaction. *British Journal of Ophthalmology.* V.77, I.2, p. 107-109, 1993.

ARAMINI, J.J.; STEPHEN, C.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *Journal of Parasitology*, v.84, n. 02, p. 438-440, 1998.

ARAMINI, J.J.; STEPHEN, C.; DUBEY, J.P.; ENGELSTOFT, C.; SCHWANTJE, H.; RIBBLE, C.S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology and Infection.*, v.122, n. 02, p.305-315, 1999.

ARANTES, T.P. Transmissão sexual do *Toxoplasma gondii* em cães (*Canis familiares*). Jaboticabal, 2005. 83p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Patologia Animal da Universidade Estadual Paulista campus de Jaboticabal.

ARAUJO, F.G.; SLIFER, T. Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. *Infection and Immunity*, v.71, n.7, p.4171-4174, 2003

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; JONES, J.L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C.C.F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State. *Brazil Emerging Infect. Dis.* 9, 55-62, 2003.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterinaermed.*, 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.

BONGSO, T.A.; JAINUDEEN, M.R.; SITI ZAHRAH, A. Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermaogenesis in goats. *Theriogenology*, Stoneham, v.18, n.5, p.513-524, 1982.

BORGOHAIN, B.N.; BENJAMIN, B.R.; BARUAH, B.; JOSHI, B.C. The testicular consistence and scrotal circumference in relation to seminal characteristics among goats (*Capra hircus*). *Indian Journal of Animal Sciences*, New Delhi, v.53, n.11, p.1233-1235, 1983.

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.; TONIOLO, G.H.; SABATINI, G. A.; MORAES, F.R.; PAULILLO, A.C.; FERRAUDO, A.S. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. *Vet. Parasitology*, v. 86, p. 143-145, 1999.

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

CAZENAVE, J.; BROUSSIN, B. ; CAMBEIH, C. ; DISCAMPS, G. Rapid detection of toxoplasma by "Polymerase Chain Reaction". Contribution to prenatal diagnosis. *Presse medicale* (Paris, France : 1983), v.21, l.5, p.221, 1992.

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

CHANTON, G.H.; THOMA, R.; CORBOZ, L.; BOREL, N.; POSPISCHIL, A. Abortion in small ruminants in Switzerland: Investigations during two lambing seasons with special regard to Chlamydiae. *Schweizer Archiv fuer Tierheilkunde*; 144 (9): 483-492, September 2002.

CHARTIER, C.; MALLEREAU, M.P.; Vaccinal efficacy of *Toxoplasma gondii* S48 strain tested in an experimental trial in goats. *Annales de Medecine Veterinaire*; 145(3): 202-209, Juillet-Aout, 2001.

CHEMINEAU, P. ; DAVEAU, A. ; MAURICE, F. ; DELGADILLO, J.A. Effects of tropical photoperiod on sexual activity of Alpine goats. In: Proceedings of the Fourth International Conference on Goats, Brasilia, Brazil, p. 269, 1987.

CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUERING, V.; ORGEUR, P. ; VALLET, J.C. ; Factors involved in variation of reproductive characteristics. In: Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. FAO,p. 61-102, 1991.

CHHABRA, M.B.; MAHAJAN, S.K.; GUPTA, S.L.; GAUTAM, O.P. Experimental toxoplasmosis in pregnant goats. *Indian Journal of Animal Sciences* 52:661-664, 1982.

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

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

COSTA, A.J. Toxoplasmose congênita natural em bovinos e infecção experimental de vacas gestantes com oocistos de *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1979. 88p. (*Tese de Doutorado*).

COSTA, A.J. Reinoculação de *Toxoplasma gondii* NICOLLE & MANCEAUX, 1909, em suínos portadores de infecção toxoplásmica experimental. Jaboticabal, Tese de Livre Docência – FCAVJ- Universidade Estadual Paulista, 105p., 1982.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p., 1998.

DISKO, R.; BRAVENY, I.; VOGEL, P. Studies on the occurrence of *Toxoplasma gondii* in the human ejaculate. *Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie* V.22, I. 4, p. 391-396, 1971.

DUBEY, J.P. Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. *Am. Journal Vet. Research*, v. 41, n. 03, p427-429, 1980.

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

DUBEY, J.P.; Toxoplasmosis in goats. *Agri-practice*, New York, n.3, v.8, p.43-52, 1987.

DUBEY, J.P.; Lesions in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts, *Veterinary Parasitology*, v .32, Issues 2-3, P. 133-144 , 1989

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

DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming of human and animals. In: KREIER, J.P. *Parasitic protozoa*. 2 ed., San Diego: Academic Press, p. 1-157. 1993

DUBEY, J.P.; BEVERLEY, J.K.A. Toxoplasmosis of animals and man. *Boca Ráton*: Academic,. 315p, 1988.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 41, n. 05, p. 794-795, 1980.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P.; LOPES, C.W.; WILLIAMS, J.F.; WILLIAMS, C.S.; WEISBRODE, S.E. Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Americam journal of Veterinary Research*, v. 41, n.7, p.1072-1076, 1980.

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. & TOWLE, A. *Toxoplasmosis in sheep*. St. Albans: Common Wealt. Institute of Parasitology, 1986.

FIGLIUOLO, L.P.C; RODRIGUES, A.A.R.; VIANA, R.B.; AGUIAR, D.M.; KASAI, N.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum*

antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. *Small Ruminant Research*, 55, p.29-32, 2004.

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

FUENTS, 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

GUESDON, J.L.; TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. The use of avidin-biotin interaction in Immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, v.27, n.08, p. 1131-1139, 1979.

GONDIM, L.F.P. et al. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.82, n.3, p.273-276, 1999.

GORDON, I.; Controlled Reproduction in sheep and goat. CAB International, Wallingford, 1997.

GREYLING, J.P.C.; GROBBELAAR, J.A.N. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rans using different collection techniques. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13, 250-252, 1983.

HIBBERT, L.M. ; RODRIGUES, H.D. ; NOBLE, R.C. ; VIG, N.M. ;GOYAL, H.O. Effects of age and season on sperm abnormalities in Nubian goats. *Anat. Histol. Embryol.* 15, 173, 1986.

HAFEZ, B. & HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 7 ed. Barueri, SP, Editora Manole, 513p, 2004.

HOMAN, H.L.; VERCAMMEN, M.; BRAEKELLER, J DE.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*, 30., p. 69-75, 2000.

JONES, J.L.; LOPES, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBIS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 56, 296-305, 2001.

KARAGIANNIDIS, A. ; VARSAKELI, S. ; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology* 53, 1285-1293, 2000

MACHADO, T.M.M.; LIMA, J.D. Frequência de anticorpos anti – *Toxoplasma gondii* em caprinos criados sob diferentes formas de exploração no Estado de Minas Gerais. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, n.2, v.39, p.255-264, 1987.

MAINARDI, R.S.; MODOLO, J.R.; STACCHINI, A. V. M.; PADOVANI, C.R.; LANGONI, H. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36: 759-761, nov-dez, 2003.

MAMIDI, A., DeSIMONE, J.A., POMERANTZ, R.J. Central nervous system infectious in individuals with HIV-1 infection. *J. Neurovirol.*, v.8, n.3, p.158-67, 2002.

MARTEMUCCI, G. ; BRAMANTE, G. ; D'ALESSANDRO, A.. IAFFLDANO, V.; BELLITTI, E. Circannual variation in quantitative semen characteristics, motility, abnormal morphology and normal acrosome of spermatozoa in Maltese bucks. *Zootecnia e Nutrizione Animale*, 24, 143-153, 1998.

MCAULEY, J., BOYER, K.M., PATEL, D. *et al* Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital

toxoplasmosis: the Chicago collaborative treatment trial. *Clin Infect Dis*, v.18, p.38-72, 1994.

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

MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. *Journal Parasitology*, v. 58, p. 928-937, 1972.

MINEO, J.P.; Protocolo de produção de antissoros anti-*Toxoplasma gondii* (comunicação pessoal), 2002.

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).

MONTOYA, J.G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet* (North American Edition), Stanford, v363 (9425), p.1965-1976, 2004

MORAES, L.C.F.; SILVA, J.F.; PIEGAS, M.S.; MARINS, S.C.R. Considerações sobre o exame clínico andrológico em carneiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.5, n.1. p.9-15, 1981.

MUNDAY, B.L.; MASON, R.W. Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats. *Australian Veterinary Journal*, Artarmon, n.10, v.55, p. 485-487, 1979.

MUNIR, A.; ZAMAN, M.; ELTORKY, M. *Toxoplasma gondii* pneumonia in a pancreas transplant patient. *South Med. Journal*, v. 93, n. 06, p. 614-617, 2000.

NISHI, S.M.; KASAI, N. ; GENNARI, S.M. Antibody levels in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Parasitology* , 87(2), p.447-452, 2001.

OLIVEIRA, F. C. R. Infecção experimental de *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* com oocistos de *Toxoplasma gondii*. Estudo comparativo. Jaboticabal, 1997. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Patologia Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus de Jaboticabal.

OKERE, C. ; CHIBOKA, O. ; MONTSMA, G. Effect of frequent ejaculation of West African dwarf goat on semen characteristics. Anim. Reprod. Sci. 11, 249-258, 1986.

PANDEY, R.P.; SINHA, S.N. SINGH, B.; AKHTAR, M.H. Characters of semen and fertility rate in Saanen and Barbari bucks. Indian J. Anim. Sci. 55, 773-774, 1985.

RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. A experimentação em genética e melhoramento de plantas, UFLA, Lavras, p.95-101, 2000.

RIEMANN, H.P.; MEYER, M.E.; THEIS, J.H.; *et al.* Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *J. Pediatr.*; 87:573-576, 1975.

ROCA, J. ; MARTINEZ, E. ; SANCHEZ-VALVERDE, M.A. ; RUIZ, S.; VASQUEZ, J.M. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. Theriogenology 38, 115-125, 1992a.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VASQUEZ, J.M.; COY, P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. Anim. Reprod. Sci, 29, 255-262, 1992b

ROSENFELD, G. Etileno diamina Tetracética Disódica (EDTA) como anticoagulante para técnica hematológica. *Vet. Clin.*, v. 31, p. 65-71, 1995.

SACKS, J.J.; ROBERTO, R.R.; BROOKS, N.F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. JAMA; 248: 1728-1732. 1982

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

SILVA, A.V. da; LANGONI, H.; DA SILVA, A.V. Foods of animal origin and human toxoplasmosis. *Higiene Alimentar*, v. 14, n. 71, p. 34-39, 2000.

SILVA, A. V.; CUNHA, E.L.P.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R.A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.1, jan-fev, p.115-119, 2003.

SMITH, B.P. Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais V.1. Editora Manole.1993

SONHA, M.P.; SINGH, B.K. Studies on the semen characteristics of Black Bengal and Saanen bucks. *Indian Vet. Med. J.* 6, 253 – 257, 1982.

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.

SREEKUMAR, C.; RAO, J.R.; MISHRA, A.K.; RAY, D.; JOSHI, P.; SINGH, R.K. Detection of toxoplasmosis in experimentally infected goats by PCR. *Veterinary Record*, v.154, l.20, p.632-635, 2004.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infections. In: ETTINGER, S.J. (Ed.), *Textbook of veterinary internal medicine*. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders,. p. 265-297, 1989.

SWISHER, C.N.; BOYER, K.; MCLEOD, R. Congenital toxoplasmosis. *Semin Pediatr Neurol*. Vol 1, p.4-25, 1994.

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

UGGLA, A.; SJOLAND, L.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *American journal of vet research*, V.48, Issue 3, p. 348-351, 1987.

UNDERWOOD, W.J.; ROOK, J.S. Toxoplasmosis infection in sheep. *The Compendium on Continued Education in Veterinary Practice*, New York, n.8, v.14, p.1543-1549, 1992.

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.

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.

VILAR FILHO, A.C.; BIRGEL, E.H.; BARNABÉ, V.H.; VISINTIN, J.A.; BARNABÉ, R.C. Características testiculares e seminais de caprinos na região semi-árida do Estado da Paraíba. I.Características testiculares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.17, n1/2, p.17-22, 1993.

VITOR, R.W.A.; FERREIRA, A.M.; FUX, B. Antibody response in goats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 81: 259-263, 1999.

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

ZAMAN, V. Morfology 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.

ZADWORNÝ e KUHLEIN. *Theor. Appl. Genet.*, v. 80, p. 631, 1990.