

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TOXOPLASMOSE: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DA
MEDULA ESPINHAL DE CÃES SOROPOSITIVOS
ASSINTOMÁTICOS**

Alessandra Cristina Francischini de Carvalho

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TOXOPLASMOSE: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DA
MEDULA ESPINHAL DE CÃES SOROPOSITIVOS
ASSINTOMÁTICOS**

Alessandra Cristina Francischini de Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Pacheco

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALESSANDRA CRISTINA FRANCISCHINI DE CARVALHO- nascida em 10 de Novembro de 1973, em Araraquara, SP, teve uma infância muito feliz, junto a sua família, e desde pequena demonstrou um carinho especial aos animais. Coursou Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, colando grau em Janeiro de 1996. Teve a oportunidade de se aprimorar durante os anos em que participou do Programa de Aprimoramento Médico Veterinário (“Residência”) em Clínica Médica Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, no período de 1997 a 1999. Defendeu sua Dissertação de Mestrado em fevereiro de 2003, adquirindo o título de Mestre em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Defendeu sua Tese de Doutorado em fevereiro de 2007, obtendo o título de Doutor em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Desde 1999 atua como médica veterinária responsável pelo setor de Clínica Médica de Pequenos Animais do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP e, desde 2003, assumiu como docente responsável pela Disciplina de Clínica Médica e Terapêutica de Pequenos Animais nesta mesma instituição de ensino superior.

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.*

*Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas
inexplicáveis e pessoas incomparáveis”*

Fernando Pessoa

Dedico esta vitória profissional aos meus queridos pais, que sempre acreditaram em meus sonhos, dando apoio e amor em todos os momentos, felizes ou difíceis.

Dedico também aos meus irmãos, que foram fonte de inspiração, carinho, paciência e determinação.

Dedico a todos os cães e gatos que passaram pela minha vida; sem eles nada faria sentido.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, não só pela oportunidade e amparo para galgar mais um degrau em minha vida profissional, mas, também, pela benção da vida e da família maravilhosa.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Maria Rita Pacheco pela atenção, amizade, paciência, compreensão, confiança e todos os ensinamentos transmitidos, durante o Mestrado como no Doutorado e, também, por acreditar nas minhas idéias e ideais.

Agradeço a Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi-Artoni, pela atenção, amizade e, principalmente, por confiar seus equipamentos em minhas mãos, para a realização da morfometria e fotomicrografias da morfologia do projeto.

Agradeço a Roberto Bertanha, pelo amor, paciência, companheirismo e por entender minha ausência.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal pela atenção, amizade e profissionalismo.

Por fim, agradeço a todos, que direta ou indiretamente, colaboraram nesta vitória.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Morfologia e morfometria do tecido nervoso da medula espinhal.....	03
2.1.1. Neurônios.....	03
2.1.1.1. Corpo celular.....	04
2.1.1.2. Dendritos.....	06
2.1.1.3. Axônio.....	06
2.1.1.4. Morfometria dos neurônios.....	07
2.1.1.5. Distribuição dos neurônios.....	08
2.1.2. Neuróglio.....	08
2.1.2.1. Astrócitos.....	09
2.1.2.2. Oligodendrócitos.....	12
2.1.2.3. Microgliócitos ou micróglio.....	12
2.1.2.4. Células endodimárias.....	13
2.2. Toxoplasmoze canina.....	14
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivos gerais.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
3.2.1. Avaliação morfológica.....	23
3.2.2. Avaliação morfométrica.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Animais.....	24
4.2. Procedimento experimental.....	24

4.3. Procedimentos morfológicos.....	25
4.4. Procedimentos morfométricos.....	25
4.5. Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Avaliação morfológica.....	27
5.1.1. Características morfológicas dos neurônios das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	27
5.1.2. Características morfológicas dos axônios e bainha de mielina das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	29
5.1.3. Características morfológicas das células da neurógliã das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	29
5.1.4. Características morfológicas das células de defesa da pia-máter das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	30
5.2. Avaliação morfométrica.....	34
5.2.1. Morfometria dos parâmetros do citoplasma e do núcleo dos neurônios das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal	34
5.2.1.1. Área do citoplasma e núcleo de neurônios.....	35
5.2.1.2. Diâmetro máximo do citoplasma e núcleo de neurônios....	36
5.2.1.3. Diâmetro mínimo do citoplasma e núcleo de neurônios.....	37
5.2.1.4. Perímetro do citoplasma e núcleo de neurônios.....	38
5.2.1.5. Fator de forma do citoplasma e núcleo de neurônios.....	39
5.2.2. Morfometria da bainha de mielina axonal da substância branca, em corte transversal, das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	40
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÃO.....	46
8. REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	64
Técnicas de coloração.....	65

LISTA DE FIGURAS

- 01 - Fotomicrografias de neurônios de cães controle (grupo 1) e cães soropositivos para toxoplasmose (grupo 2), das regiões cervical (RC), torácica (RT) e lombar (RL), da medula espinhal..... 28
- 02 - Fotomicrografias de axônios (setas), com diferentes calibres, envoltos pela bainha de mielina (cabeças de seta) de cães controle (grupo 1) e cães soropositivos para toxoplasmose (grupo 2), das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal..... 31
- 03 - Fotomicrografias de células da neuróglia da medula espinhal de cães controle (grupo 1) e cães soropositivos para toxoplasmose (grupo 2), corados pela impregnação pela prata..... 32
- 04 - Fotomicrografias de células da neuróglia da medula espinhal de cães controle (grupo 1) e cães soropositivos para toxoplasmose (grupo2)..... 33

LISTA DE TABELAS

01 - Comparação entre as médias da variável área do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	35
02 - Comparação entre as médias da variável diâmetro máximo do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	36
03 - Comparação entre as médias da variável diâmetro mínimo do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	37
04 - Comparação entre as médias da variável perímetro do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	38
05 - Comparação entre as médias da variável fator de forma do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.....	39
06 - Comparação entre as médias (μm) da espessura da bainha de mielina de axônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal...	40

TOXOPLASMOSE: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DA MEDULA ESPINHAL DE CÃES SOROPOSITIVOS ASSINTOMÁTICOS

RESUMO - Este trabalho objetivou analisar a morfologia e a morfometria das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal de cães. Utilizou-se vinte cães sem raça definida, adultos, sendo dez cães hígidos, com sorologia negativa para toxoplasmose, utilizados como controle (grupo 1) e dez cães soropositivos para toxoplasmose (grupo 2). Para o estudo morfométrico, obtido por meio de um sistema analisador de imagens, os parâmetros analisados foram: área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e fator de forma do citoplasma e núcleo dos neurônios. Também se avaliou a espessura da bainha de mielina axonal. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, mediante o teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. Com relação a morfologia, não se observaram diferenças entre os dois grupos e as características morfológicas se apresentaram de acordo com a literatura. Baseado na morfometria, notou-se que os neurônios dos cães soropositivos eram maiores e mais arredondados em comparação aos do grupo controle, devido a um possível edema celular. Não houve diferença estatística na espessura da bainha de mielina entre os grupos estudados. Conclui-se que não houve alteração morfológica visível, pela microscopia de luz, em ambos os grupos, naquela ocasião. Os resultados morfométricos demonstram que há alteração no tamanho e estrutura dos neurônios, ocorrendo aumento e perda do formato estrelado, nos animais soropositivos, provavelmente devido a um processo de edema celular. Estes resultados sugerem que outras investigações deverão ser feitas para se comprovar a hipótese de que os neurônios destes cães, ainda assintomáticos, perderam a função condutora.

Palavras-chave: cão, medula espinhal, morfologia, morfometria, toxoplasmose

TOXOPLASMOSIS: SPINAL CORD MORPHOLOGY AND MORPHOMETRY OF ASSYNTOMATICS SEROPOSITIVES DOGS

SUMMARY – The aim of this study was to analyze canine spinal cord morphology and morphometry of cervical, thoracic and lumbar regions. Twenty adult dogs were studied, ten toxoplasmosis seronegative, used as control (group 1) and ten seropositive above 1:256 (group 2). For the morphometry, the parameters were area, maximum and minimum diameter, perimeter and roundness, of neurons' cytoplasm and nucleus. Axon myelin sheath thickness also was measured. The results were statistically analyzed by Student's t-test, with a significance level of 5%. There were no morphologic differences between the two groups, and the morphologic characteristics were in agreement with literature. Based on morphometry, neurons of seropositive dogs were greater and had a more rounded shape when compared with control group, due to a possible cellular edema. Statistically significant differences were not found for axon myelin sheath thickness among groups. We can conclude that there was no visible morphologic alteration, at the time of the study but, the morphometric results showed that there were changes in neurons size and shape, occurring size increases and lose of the star shape in seropositive dogs, probable because of cellular edema. These results suggests others studies to prove the hypothesis that neurons of these dogs, still assyntomatics, lost there conductive function.

Keywords: dog, spinal cord, morphology, morphometry, toxoplasmosis

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) são importantes causas de distúrbios neurológicos em cães. Muitas delas são causadas por agentes infecciosos específicos, como os vírus da cinomose e da raiva, os protozoários e os fungos, além daquelas de origem inespecífica (MORETTI et al., 2002).

As doenças neurológicas caninas causadas por protozoários são pouco comuns (HASS et al., 1989; THOMAS, 1998). As encefalites por estes agentes, em cães, são, na maioria das vezes, provocadas por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) e *Neospora caninum*.

A toxoplasmose, zoonose com distribuição mundial, foi relatada, pela primeira vez, em 1908. O agente causal, *Toxoplasma gondii*, um protozoário coccidial, mereceu imediata atenção de pesquisadores de todo o mundo, desde a descrição da espécie.

A importância que representa a toxoplasmose animal decorre, principalmente, pelo fato dos animais infectados servirem de fonte direta ou indireta de infecção ao homem.

Outro fator observado é o aumento da importância da toxoplasmose humana, ocorrendo muitas mortes devido à toxoplasmose congênita em neonatos e em pacientes imunodeprimidos (TODD, 1989; SMITH, 1993), pela reativação de cistos, principalmente no cérebro, produzindo, conseqüentemente, grave encefalite (ZAJDENWEBER et al., 2005). Nos EUA, a freqüência de encefalites por *T. gondii* é de 6 a 10% e no oeste da Europa, de 25 a 40%.

Os avanços nas técnicas de diagnóstico têm mostrado a vasta distribuição e ocorrência da toxoplasmose tanto humana como animal (ISHIZUKA et al., 1974).

Sabe-se, da literatura, que a investigação da infecção na população canina é um indicador da contaminação ambiental doméstica e possível risco ao ser humano (LANGONI et al., 2006), pois a exposição humana e canina ocorre frente a uma fonte comum de infecção (BRITO et al., 2002; MEIRELES et al., 2004). Além disso, devido ao hábito dos cães rolarem ou ingerirem fezes felinas, contendo oocistos de *T. gondii*, há o risco de contaminação do ambiente doméstico, expondo proprietários à toxoplasmose

(FRENKEL et al., 1995; LANGONI et al., 2006), pois já foi demonstrado que após a ingestão de oocistos não esporulados pelos cães, estes eliminam oocistos infectantes (LINDSAY et al., 1997).

Diante destas informações, faz-se justificável esta pesquisa ao analisar a ocorrência de alterações precoces nas estruturas que compõem o tecido nervoso da medula espinhal de cães aparentemente saudáveis, mas com titulação para *T. gondii* acima de 1:256, antes do início de sintomatologia clínica, com o intuito de complementar a literatura, pela investigação e documentação dessas possíveis alterações e levantar a questão da necessidade de tratamento destes cães altamente reativos antes do início de distúrbios clínicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DO TECIDO NERVOSO DA MEDULA ESPINHAL

Importantes observações anatômicas e fisiológicas a respeito do Sistema Nervoso foram descritas desde Rufus de Ephesus (A.C. 110-180). Em 1664, Thomas Willis publicou *De Anatome Cerebri*, que passou a ser então o mais perfeito resumo a respeito do Sistema Nervoso (LYONS e PETRUCELLI, 1987).

O tecido nervoso compreende, basicamente, dois tipos celulares: os neurônios e as células gliais ou neuróglia (ROSS et al., 1995; CHRISMAN, 1997; GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Estes dois tipos básicos de células distinguem-se pela origem, estrutura e funções (MACHADO, 2002).

O neurônio é a sua unidade fundamental ou anatômica (BANKS, 1992), com a função básica de receber, processar e enviar informações. A neuróglia, ou glia, compreende células que ocupam os espaços entre os neurônios, com funções de sustentação, nutrição, revestimento ou isolamento, modulação da atividade neuronal e defesa (BREAZILE, 1982; ROSS et al., 1995; CHRISMAN, 1997; GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002).

2.1.1. Neurônios

São células altamente excitáveis que se comunicam entre si ou com células efetoras (células musculares e glandulares) (GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002), usando uma linguagem elétrica, qual seja, modificações do potencial de membrana. Os neurônios possuem morfologia complexa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) e diversidade tridimensional (BANKS, 1992), mas a maioria dos neurônios possui três regiões responsáveis por funções especializadas: o corpo celular e seus

prolongamentos: os dendritos (do grego, *déndron* = árvore) e o axônio (do grego, *áxon* = eixo) (MACHADO, 2002). Em geral, o volume total dos prolongamentos de um neurônio é maior do que o volume do corpo celular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.1.1.1. Corpo Celular

Contém núcleo e citoplasma com as organelas citoplasmáticas usualmente encontradas em outras células dos mamíferos (BREAZILE, 1982; ROSS et al., 1995; GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002).

O núcleo é geralmente vesiculoso, com um ou mais nucléolos evidentes (MACHADO, 2002), esférico e pouco corado (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), eucromático (ROSS et al., 1995), grande e com cromatina frouxa (GEORGE e CASTRO, 1998) e, na maioria dos neurônios, está localizado no centro do corpo celular (BANKS, 1992), mas também pode ser encontrado em posição mais excêntrica, ou seja, próximo à membrana celular, especialmente nos neurônios do sistema nervoso central (BREAZILE, 1982) .

O citoplasma do corpo celular recebe o nome de pericário (MACHADO, 2002). Neste, salienta-se a riqueza em ribossomos, retículo endoplasmático granular e agranular e aparelho de Golgi, sendo que este foi descrito pela primeira vez nos neurônios (GEORGE e CASTRO, 1998).

Os ribossomos podem concentrar-se em pequenas áreas citoplasmáticas onde ocorrem livres ou aderidos as cisternas do retículo endoplasmático (GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002). Em consequência, à microscopia óptica, vêem-se grumos basófilos, conhecidos como corpúsculos de Nissl (ROSS et al., 1995; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), substância cromidial ou corpos tigróides, pois os grânulos de Nissl dão uma aparência tigróide ao corpo celular (BREAZILE, 1982). A quantidade de retículo endoplasmático rugoso varia com o tipo e o estado funcional dos neurônios, sendo mais abundante nos maiores, particularmente nos neurônios motores (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Microtúbulos de 24 nm de diâmetro (GEORGE e CASTRO, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) e microfilamentos de actina são idênticos aos de

células não-neuronais, mas os filamentos intermediários (8 a 11 nm de diâmetro) diferem, por sua constituição bioquímica, das demais células, e são específicos dos neurônios, razão pela qual se denominam neurofilamentos (MACHADO, 2002), abundantes tanto no pericário como nos prolongamentos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), demonstráveis por impregnação argêntica e, ao contrário do que se pensava, não estão associados à condução de impulso nervoso (GEORGE e CASTRO, 1998).

O formato do corpo celular é bastante variável, podendo ser esférico, ovóide, piramidal, fusiforme, estrelado ou em forma de lua crescente (BREAZILE, 1982; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Além da forma, o tamanho do corpo celular também é extremamente variável, conforme o tipo de neurônio, podendo variar de 3 a 150 μm (BANKS, 1992; GEORGE e CASTRO, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Já MACHADO (2002) cita que, nas células de Purkinje do córtex cerebelar, os corpos celulares são piriformes e grandes, com diâmetro médio de 50-80 μm ; nesse mesmo córtex, nos grânulos do cerebelo, são esferoidais, com diâmetro de 4-5 μm (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004); nos neurônios sensitivos dos gânglios espinhais são também esferoidais, mas com 60-120 μm de diâmetro; corpos celulares estrelados e piramidais são também comuns, ocorrendo, por exemplo, no córtex cerebral.

Do corpo celular partem os prolongamentos (dendritos e axônio), porém as técnicas histológicas de rotina mostram apenas o corpo neuronal e, nos maiores, as porções iniciais de seus prolongamentos. A visualização desses últimos exige técnicas especiais de coloração (MACHADO, 2002).

O corpo celular é, como os dendritos, local de recepção de estímulos, através de contatos sinápticos. Nas áreas da membrana plasmática do corpo neuronal que não recebem contatos sinápticos apoiam-se elementos gliais (MACHADO, 2002).

2.1.1.2. Dendritos

Geralmente são curtos (de alguns micrômetros a alguns milímetros de comprimento) e ramificam-se profusamente, à maneira de galhos de uma árvore, em ângulo agudo, originando dendritos de menor diâmetro (ROSS et al., 1995; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) e seu número varia de um a vários por

neurônio (GEORGE e CASTRO, 1998), apresentando diâmetro maior que o axônio (ROSS et al., 1995). Geralmente são amielínicos (ROSS et al., 1995) e podem apresentar os mesmos constituintes citoplasmáticos do pericário (ROSS et al., 1995; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os dendritos são especializados em receber estímulos, traduzindo-os em alterações do potencial de repouso da membrana celular (MACHADO, 2002) e conduzem este impulso em direção centrípeta, ou seja, em direção ao corpo celular (BANKS, 1992; ROSS et al., 1995; GEORGE e CASTRO, 1998).

2.1.1.3. Axônio

A grande maioria dos neurônios possui um axônio, prolongamento longo e fino que se origina do corpo celular ou de um dendrito principal, em região denominada cone de implantação, praticamente desprovida de substância cromidial (GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O axônio apresenta comprimento muito variável, dependendo do tipo de neurônio, podendo ter, na espécie humana, de alguns milímetros a mais de um metro (MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Estruturalmente, apresenta, além da membrana plasmática ou axolema, o citoplasma axônico ou axoplasma, contendo poucos microtúbulos, microfilamentos, retículo endoplasmático agranular, mitocôndrias, vesículas e freqüentes neurofilamentos (ROSS et al., 1995; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O axônio é especializado em conduzir o impulso nervoso em direção centrífuga, ou seja, afastando-se do corpo celular (BANKS, 1992; ROSS et al., 1995; GEORGE e CASTRO, 1998).

Segundo ZHANG et al. (1995) há uma diminuição no número e tamanho dos axônios em decorrência do processo de envelhecimento.

2.1.1.4. Morfometria dos neurônios

O tamanho do corpo celular é extremamente variável, conforme o tipo de neurônio, podendo variar de 3 a 150 μm (BANKS, 1992; GEORGE e CASTRO, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Já MACHADO (2002) cita que, nas células de Purkinje do córtex cerebelar, os corpos celulares são piriformes e grandes, com diâmetro médio de 50-80 μm ; nesse mesmo córtex, nos grânulos do cerebelo, os corpos celulares são esferoidais, com diâmetro de 4-5 μm (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004); nos neurônios sensitivos dos gânglios espinhais são também esferoidais, mas com 60-120 μm de diâmetro.

Segundo CARVALHO et al. (2006), em cães, o tamanho do citoplasma e do núcleo, dos neurônios da medula espinhal, também é bastante variável, dependendo da localização dos neurônios, sendo que os situados na região lombar são, estatisticamente, maiores do que os encontrados nas regiões cervical e torácica. Também citam que estes neurônios lombares, estatisticamente, possuem formato mais arredondado que os neurônios das outras regiões, fato comprovado através da análise do parâmetro morfométrico fator de forma celular.

2.1.1.5. Distribuição dos Neurônios

A imensa maioria dos neurônios tem seus corpos celulares localizados no sistema nervoso central (SNC), ou seja, encéfalo e medula espinhal.

Observa-se ainda que os corpos celulares se agrupam ocupando determinadas regiões nestes órgãos, sendo que seus prolongamentos ficam em locais onde não ocorrem corpos celulares.

Como os prolongamentos normalmente estão associados à mielina, que a fresco tem cor branca, distingue-se nos órgãos nervosos regiões de cor esbranquiçada (onde existem prolongamentos com mielina) e regiões de cor cinza (onde existem prolongamentos com corpos celulares e sem mielina) denominadas, respectivamente, Substância Branca e Substância Cinzenta e, na medula espinhal, a substância cinzenta ocupa uma região central, exibindo forma de H em corte transversal, mas alguns grupos de corpos celulares podem estar presentes na substância branca, sendo chamados de núcleos (GEORGE e CASTRO, 1998).

2.1.2. Neurógli

A neurógli foi descrita pela primeira vez por Virchow em 1846 (PETERS et al., 1991). Tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico, os neurônios relacionam-se com células coletivamente denominadas neurógli, gli

ou gliócitos (ROSS et al., 1995; MACHADO,2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). São as células mais freqüentes do tecido nervoso, podendo a proporção entre neurônios e células gliais variar de 1:10 a 1:50 (MACHADO,2002).

No sistema nervoso central, a neurógli compreende: astrócitos, oligodendrócitos, microgliócitos e um tipo de gli com disposição epitelial, as células endimárias (ROSS et al., 1995; GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002). Essas células, com exceção dos microgliócitos, derivam-se do neuroectoderma (MACHADO, 2002).

Os astrócitos e oligodendrócitos são coletivamente denominados como macrógli e os microgliócitos como micrógli. A macrógli e a micrógli colocam-se entre os neurônios e possuem corpo celular que contém um núcleo e massa citoplasmática distribuída principalmente em prolongamentos (GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002) que, à microscopia óptica, são visualizados apenas com técnicas especiais, envolvendo, por exemplo, impregnação pela prata ou ouro (MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) ou métodos imunohistoquímicos (ROSS et al., 1995).

SAVRO (1996) observou que a macrógli, nos animais mais evoluídos, principalmente primatas e humanos, está bastante diferenciada, com desenvolvida especialização morfofuncional e também se encontra em um número maior ao redor dos neurônios (gli satélite).

Na vida embrionária, as células gliais participam da orientação do crescimento dos dendritos e axônios, o que leva ao estabelecimento das sinapses adequadas do ponto de vista funcional (ROSS et al., 1995; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As células da neurógliia não geram impulsos nervosos nem formam sinapses (ROSS et al., 1995; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Todavia, participam do controle da composição química do meio onde estão localizados os neurônios (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.1.2.1. Astrócitos

Seu nome vem da forma semelhante à estrela. São abundantes (MACHADO, 2002) e representam as maiores células gliais, sendo caracterizados por inúmeros prolongamentos (GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002), restando pequena massa citoplasmática ao redor do núcleo esférico ou ovóide, central e vesiculoso (MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Reconhecem-se dois tipos morfológicos principais: astrócitos protoplasmáticos, localizados na substância cinzenta e astrócitos fibrosos, encontrados na substância branca (HIRANO, 1985; CHRISMAN, 1997; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A distinção entre os dois tipos celulares é baseada na configuração e número de prolongamentos e na localização (LANTOS, 1990). Os primeiros distinguem-se por apresentar prolongamentos mais espessos e curtos que se ramificam profusamente e, são, muitas vezes, satélites do soma neuronal, tendo, assim, uma morfologia sinuosa e mais delicada (HIRANO, 1985); já os prolongamentos dos astrócitos fibrosos são finos e longos e ramificam-se relativamente pouco (ROSS et al., 1995; MACHADO, 2002).

GEORGE e CASTRO (1998) descrevem, ainda, um outro tipo de astrócito, o misto, que ocorre no limite entre as substâncias branca e cinzenta, cujos prolongamentos que se dirigem à substância branca são do tipo fibroso e os que se dirigem à substância cinzenta são do tipo protoplasmático.

Ambos os tipos de astrócitos, através de expansões dos prolongamentos, conhecidas como pés vasculares, apoiam-se em capilares sangüíneos, formando junções oclusivas que constituem a barreira hematoencefálica (BUTT, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Também formam uma camada localizada na superfície do tecido nervoso, logo abaixo da pia-máter. Assim, estas células criam um compartimento funcional para o tecido nervoso, com as moléculas e íons adequados ao bom funcionamento dos neurônios (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Seus processos contatam também os corpos neuronais, dendritos e axônios e, de maneira especial, envolvem as sinapses, isolando-as, formando circuitos neuronais independentes, impedindo a propagação desordenada dos impulsos nervosos destes circuitos (ROSS et al., 1995; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Têm, portanto, funções de sustentação, nutrição e isolamento de neurônios (MACHADO, 2002).

A interação anatômica dos pés terminais dos astrócitos com os vasos sangüíneos evidencia envolvimento destas células com funções na barreira hematoencefálica, inclusive no transporte de nutrientes e metabólitos entre a glia e os neurônios (BRIGTMAN, 1991). Há evidências que participem do controle dos níveis de potássio extraneuronal, captando este íon e ajudando na manutenção de sua baixa concentração extracelular e sejam o principal sítio de armazenamento de glicogênio no sistema nervoso central, havendo evidências de que possam liberar glicose para uso dos neurônios (KIMELBERG, 1988; MACHADO, 2002).

Também sintetizam substâncias tróficas para os neurônios e retiram neurotransmissores do meio extracelular (ROSS et al., 1995; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Em resposta a uma injúria, há uma complexa resposta celular imune, envolvendo astrócitos e micróglia (LEMOS, 1995).

Os astrócitos aumentam, em número (processo de proliferação) e volume celular (hipertrofia), localmente e ao redor dos sítios de injúria, por mitoses, ocupando áreas lesadas, sendo o principal componente do processo cicatricial (MORIARTY e BORGES, 2001). Esse processo de proliferação celular chama-se gliose (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) ou astrogliose (ENG et al., 1992; JUBB, 1993).

Apresentam atividade fagocítica (WATABE et al., 1989; WAGNER e RAYMOND, 1991) e atuam como células apresentadoras de antígenos (MONTGOMERY, 1994). Em caso de degeneração axônica, adquirem função fagocítica

ao nível das sinapses, ou seja, qualquer botão sináptico em degeneração é internalizado por astrócitos (MACHADO, 2002).

Na vida embrionária, precursores de astrócitos, as células gliais, que se estendem da superfície dos ventrículos cerebrais à superfície do cérebro revestida pela pia-máter fornecem arcabouço para a migração de neurônios (MACHADO, 2002). Quando esta função de orientação não é mais requerida, a glia radial transforma-se em astrócitos, protoplasmáticos ou fibrosos (FEDOROFF, 1986).

2.1.2.2. Oligodendrócitos

São menores que os astrócitos e possuem poucos e curtos prolongamentos (GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), que também podem formar pés vasculares (ROSS et al., 1995; MACHADO, 2002).

Em secções histológicas, apresentam núcleo menor e mais condensado que o dos astrócitos (MACHADO, 2002).

São encontrados tanto na substância branca como na cinzenta (CHRISMAN, 1997; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Conforme sua localização, distinguem-se dois tipos: oligodendrócito satélite ou perineuronal, situado junto ao pericário e dendritos, formando uma verdadeira “simbiose” com os neurônios e oligodendrócito fascicular, encontrado entre as fibras nervosas (GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os oligodendrócitos fasciculares são responsáveis pela formação da bainha de mielina em axônios do sistema nervoso central (ROSS et al., 1995; GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A perda de um oligodendrócito pode resultar na desmielinização segmentar de vários neurônios (CHRISMAN, 1997).

2.1.2.3. Microgliócitos ou Micróglia

São células pequenas e alongadas com núcleo denso também alongado e de contorno irregular e possuem poucos e curtos prolongamentos, que partem das suas extremidades (GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002), cobertos por saliências finas, o que lhes confere um aspecto espinhoso (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

São encontrados tanto na substância branca como na cinzenta e apresentam funções fagocíticas (CHRISMAN, 1997; GEORGE e CASTRO, 1998; MACHADO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Alguns autores acreditam que os microgliócitos de tecido nervoso normal sejam apenas células pouco diferenciadas, capazes de transformarem-se em astrócitos ou oligodendrócitos. Entretanto, inúmeras evidências indicam serem os microgliócitos de origem mesodérmica ou, mais precisamente, de monócitos, equivalendo no sistema nervoso central a um tipo de macrófago, com funções de remoção, por fagocitose, de células mortas, detritos e microorganismos invasores (MACHADO, 2002).

Aumentam em caso de injúria e inflamação, especialmente por novo aporte de monócitos, vindos pela corrente sangüínea. Nesse caso, são denominados microgliócitos reativos, podendo estar repletos de vacúolos digestivos, contendo restos celulares (MACHADO, 2002).

2.1.2.4. Células Ependimárias

São remanescentes do neuroepitélio embrionário, se mantendo em arranjo epitelial (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), sendo coletivamente designadas como epêndima ou epitélio ependimário (ROSS et al., 1995; MACHADO, 2002).

São células cuboidais ou prismáticas nos adultos, mas pseudoestratificada, não uniforme nos filhotes (MITRO et al., 1996), presentes nas cavidades naturais do SNC, revestindo, como epitélio de revestimento simples, as paredes dos ventrículos cerebrais, do aqueduto cerebral e do canal central da medula espinhal (ROSS et al., 1995; GEORGE e CASTRO, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), formando uma barreira entre o sistema nervoso central e o líquido cefalorraquidiano (CHRISMAN, 1997).

Apresentam em sua face luminal inúmeras microvilosidades, geralmente ciliadas. Cada célula ependimária possui um prolongamento ou processo basal que penetra o tecido nervoso ao redor das cavidades (MACHADO, 2002).

Nos cortes histológicos corados pela Hematoxilina-eosina, o sistema nervoso central exhibe apenas núcleos (de neurônios, células da glia e vasos), raras vezes pericários e uma região, entre os núcleos, de cor rósea, que representa os prolongamentos das células do tecido nervoso e que recebe o nome genérico de neurópila (GEORGE e CASTRO,1998).

2.2 TOXOPLASMOSE CANINA

A toxoplasmose teve sua etiologia esclarecida quase simultaneamente por NICOLLE e MANCEAUX (1908) na Tunísia e SPLENDORE (1908) no Brasil. É uma zoonose com distribuição mundial (SANTOS et al, 1968; KEAN, 1972; JACOBS e MELTON, 1973; HIRT, 1976; DUBEY e HILL, 2002; LAPPIN, 2004; LANGONI et al., 2006).

O agente causal, *T. gondii*, um protozoário coccidial, mereceu imediata atenção de pesquisadores de todo o mundo, desde a descrição da espécie (CARINI, 1911; MIGLIANO, 1912; CARINI e MACIEL, 1913; MONICI, 1947; PARAENSE e VIANA, 1948; NEVES et al., 1954; SALIBA et al., 1958; CASTRO et al., 1962; CAMARGO, 1964; SANTOS et al., 1968; DEANE et al., 1971; COSTA et al., 1977).

A importância que representa a toxoplasmose animal decorre, em primeiro lugar, pelo fato dos animais infectados servirem de fonte direta ou indireta de infecção ao homem e, em segundo lugar, pelos danos diretos que a doença provoca em animais de interesse econômico e de estimação (OLIVEIRA, 1997).

Outro fator observado é o aumento da importância da toxoplasmose humana, ocorrendo muitas mortes devido à toxoplasmose congênita em neonatos e em pacientes imunodeprimidos (TODD, 1989; SMITH, 1993), pela reativação de cistos, principalmente no cérebro, produzindo, conseqüentemente, grave encefalite (ZAJDENWEBER et al., 2005).

Desde a descrição em 1910 por Mello na Itália (VIDOTTO, 1992) e por CARINI (1911) no Brasil, a toxoplasmose canina tem despertado grande interesse dos pesquisadores, sendo seu ciclo de vida e as diferentes formas de transmissão bastante discutidos na literatura veterinária (HASS et al, 1989; LAPPIN, 2004). Os cães são considerados como animais de alta receptividade para esta zoonose, provavelmente, devido ao hábito de alimentação carnívora, que facilita a ingestão de tecidos contaminados por cistos e ao contato com oocistos esporulados no solo contaminado (GERMANO et al., 1985).

Em cães e gatos, a infecção tem sido assinalada em diversos países, demonstrando seu caráter cosmopolita, sendo relatados casos severos e fatais, embora, as manifestações clínicas sejam incomuns devido a eficiência do *T. gondii* como parasita (DUBEY e BEATTLE, 1988; HASS et al, 1989; LINDSAY, 1990; GUIMARÃES et al, 1992; PAIXÃO e SANTOS, 2004).

O esclarecimento de importantes aspectos epidemiológicos da toxoplasmose, dentre eles a participação dos felídeos, tanto domésticos quanto silvestres, no ciclo biológico do protozoário (HUTCHISON, 1968; HUTCHISON, 1970; FRENKEL et al., 1970 e DUBEY et al., 1972), abriu novas fronteiras para a realização de trabalhos de pesquisa aplicados sobre essa zoonose. Os gatos e outros felídeos selvagens são os únicos hospedeiros definitivos, mas, também, atuam como hospedeiros intermediários, assim, como os outros mamíferos e aves, devido ao encistamento das formas multiplicantes extra-intestinais, nos tecidos de vários órgãos (DAVIDSON, 2000).

Há três formas principais de transmissão do *T. gondii*: (i) ingestão de oocisto esporulado devido ao contato com as fezes de gatos infectados, (ii) ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos com bradizoítos (forma mais freqüente de transmissão em carnívoros) e (iii) transmissão congênita, que pode ocorrer no homem, na vaca (COSTA, 1979), na ovelha e em outros animais, sendo rara em cães e gatos (BRESCIANI et al., 1999; DAVIDSON, 2000; BRITO et al., 2002; LAPPIN, 2004; LANGONI et al., 2006), mas, *T. gondii* também pode ser transmitido por transfusão sangüínea, transplante de órgãos ou leite não pasteurizado (TENTER, 1999; TENTER et al., 2000).

Sabe-se que os oocistos constituem as principais formas infectantes de *T. gondii* para diversas espécies de animais domésticos (COSTA et al., 1977; KANETO et al., 1995; LAPPIN, 2004) e selvagens, como lontras (CONRAD et al., 2005) e canídeos silvestres (GENNARI et al., 2004), em consequência à sua grande resistência às condições ambientais (YLMAZ e HOPKINS, 1972; LAPPIN, 2004).

Estas formas encontram-se amplamente disseminadas em áreas onde circulam gatos (RUIZ et al., 1973), podendo ser difundidas ainda por artrópodes (WALLACE, 1971), por anelídeos terrestres (MARKUS, 1974; RUIZ e FRENKEL, 1980)

e cães infectados (FRENKEL e PARKER, 1996; LINDSAY et al., 1997), principalmente através da urina e da saliva destes últimos (BRESCIANI et al., 2001).

Segundo SWANGO et al. (1992) e LAPPIN (2004), os gatos tornam-se infectados pela ingestão de esporozoítos em oocistos esporulados, ou pela ingestão de cistos extra-intestinais de bradizoítos ou taquizoítos nos tecidos dos hospedeiros intermediários. Há dois tipos diferentes de multiplicação após a infecção: o ciclo enteroepitelial ou intestinal, que ocorre somente em felídeos, e o ciclo extra-intestinal, que ocorre em todas as espécies que servem de hospedeiro intermediário, como peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, incluindo o homem.

No ciclo extra-intestinal, os microrganismos penetram a mucosa intestinal e se multiplicam nas células da submucosa, sendo denominados taquizoítos, infectando e multiplicando-se em qualquer tipo de célula, como células do fígado, pulmões e tecido linfóide. Após 2 semanas, há o início da imunidade no hospedeiro, diminuindo a taxa de multiplicação, pois a imunidade destrói os taquizoítos, mas os bradizoítos, microrganismos de multiplicação lenta, que ficam presos dentro de uma parede cística elástica no citoplasma das células infectadas, são protegidos por este cisto intracelular, permanecendo viáveis durante anos, num estado encarcerado (SWANGO et al., 1992).

Os bradizoítos encistados podem ser encontrados na maioria dos sistemas, principalmente tecido nervoso do SNC, tecidos muscular e retiniano. A imunossupressão, devida à quimioterapia ou doenças debilitantes, pode reativar a multiplicação, com os bradizoítos revertendo para taquizoítos em proliferação (SWANGO et al., 1992; LAPPIN, 2004; PAIXÃO e SANTOS, 2004). Nesta fase, o parasito, primeiramente, afeta os sistemas nervoso, digestório, ocular e respiratório, sendo observado uma grande variedade de sinais clínicos, dependendo do grau de necrose celular (SWANGO et al., 1992).

A manutenção do *T. gondii* dentro do sistema nervoso após a fase sistêmica da doença está relacionada à impermeabilidade da barreira hematoencefálica aos anticorpos circulantes, sendo que a sorologia do líquido cefalorraquidiano não demonstra resultados consistentes para diagnosticar a toxoplasmose nervosa (HASS et al., 1989).

Apesar da elevada freqüência de infecções inaparentes, a toxoplasmose pode manifestar-se como doença sistêmica severa apresentando quadro de pneumonia, enterite hemorrágica, convulsões, ataxia (PIMENTA et al., 1993), febre, perda de peso, anorexia, pancreatite e uveíte (LAPPIN, 2004), pois os sintomas da toxoplasmose em cães são variáveis, e dependem da idade, da presença de infecções concomitantes, da severidade da infecção e dos órgãos afetados (SALIBA et al., 1958; COSTA et al., 1977; DAVIDSON, 2000).

SHARMA et al. (1973) descreveram, em cães experimentalmente infectados, as seguintes alterações: hipertermia, distúrbios pulmonares, digestórios, neurológicos e linfadenopatia. Ataxia, convulsões, tremores, déficits dos nervos cranianos, paresia e paralisia são as manifestações mais comuns da toxoplasmose no SNC (LAPPIN, 2004).

Em cães jovens, os sintomas mais freqüentes são gastrintestinais e respiratórios, mas também pode ocorrer manifestação neuromuscular, caracterizada por radiculoneurite e miosite, levando à paresia e à paralisia progressivas, às vezes com envolvimento do SNC (BRAUND, 1988; PAIXÃO e SANTOS, 2004). Em cães adultos, os sintomas são variáveis e inespecíficos, como anorexia, febre, letargia, dispnéia e diversos sinais neurológicos quando há o envolvimento do SNC (BRAUND et al., 1988, DAVIDSON, 2000).

AVERILL e LAHUNTA (1971) estudaram o SNC de 04 cães afetados com toxoplasmose. Paraplegia flácida, paraplegia espástica, ataxia com tremor intencional e hemiparesia com perda de metade do campo visual foram resultantes de lesões de raiz espinhal, medula espinhal, cerebelares e cerebrais unilaterais. NESBIT et al. (1981) e SUTER et al. (1984) observaram paresia espástica de membro posterior em cães naturalmente infectados por *T. gondii*.

Segundo HASS et al. (1989) as manifestações neurológicas podem ser divididas em processo central (freqüentemente associada com rápida progressão sintomatológica) e neuropatia periférica (freqüentemente associada com miosite nos jovens, mais cronicamente afetados), mas a doença é, por natureza, difusa e progressiva.

Os órgãos mais comumente lesados, em cães, são pulmões e fígado (NEVES et al., 1954; SALIBA et al., 1958; SANTOS et al., 1968). Por outro lado,

SOGORB et al. (1972), HASS et al. (1989), GIRALDI et al. (2002) e PAIXÃO e SANTOS (2004) enfatizaram que o cérebro também é órgão alvo de *T. gondii* no organismo canino. As lesões macroscópicas mais freqüentes são necrose cerebral, pulmonar, hepática e de linfonodos mesentéricos (DUBEY e LAPPIN, 1998). Hepatomegalia e áreas focais de necrose foram descritas por NEVES et al. (1954), SALIBA et al. (1958), SANTOS et al. (1968), SHARMA et al. (1973) e COSTA et al. (1977). No SNC, áreas de descoloração, necrose e atrofia cerebelar foram observadas (DUBEY e LAPPIN, 1998).

BRAUND et al. (1988) referem que cães acima de um ano de idade geralmente apresentam sinais de lesão multifocal no SNC, sendo tais sinais associados com lesões inflamatórias difusas no cérebro e medula espinhal.

No Brasil, PIMENTA et al. (1993) descreveram quadro de toxoplasmose em 03 cães, de 03 a 10 meses de idade. Lesão primária caracterizada por miosite necrosante associada a numerosos taquizoítos e sorologia positiva para *T. gondii* possibilitaram o diagnóstico.

As manifestações oculares, incluindo retinite, uveíte anterior, iridociclite e neurite óptica, ocorrem em determinados cães com toxoplasmose, mas são menos comuns do que no gato (LAPPIN, 2004).

Em 60 cães naturalmente infectados, PIPER et al. (1970) observaram que a principal localização de lesões oculares por *T. gondii* ocorreu no corpo ciliar da retina.

HELLEY (1970) afirmou que a toxoplasmose pode produzir uma série de alterações tais como encefalite, abortamento, pneumonia, enterite, miosite e, ocasionalmente, coriorretinite, sendo esta última frequentemente associada à uveíte.

As alterações histopatológicas mais comuns no SNC são caracterizadas por meningoencefalomielite não supurativa associada à vasculite, necrose, malácia e gliose, com eventual envolvimento dos nervos periféricos (DUBEY e BEATTLE, 1988; DUBEY e LAPPIN, 1998; GIRALDI et al., 2002).

A toxoplasmose clínica em cães geralmente está associada ao vírus da cinomose ou outras infecções, como erlichiose, ou com terapia imunossupressora (DUBEY et al., 1990; PIMENTA et al., 1993; GIRALDI et al., 2002). EHRENSPERGER e POPISCHIL (1989) verificaram que a toxoplasmose clínica está associada ao vírus da

cinomose em 54% dos casos. Em alguns casos, contudo, os fatores predisponentes não são identificados. Historicamente, a prevalência da toxoplasmose tem diminuído com o uso de vacinas contra cinomose (DUBEY e LAPPIN, 1998).

Não há alterações clinicopatológicas ou radiográficas patognomônicas nos cães e gatos com toxoplasmose (LAPPIN, 2004). A confirmação do diagnóstico depende do isolamento do parasito, da demonstração histológica do organismo nas lesões e de sorodiagnóstico positivo (PAIXÃO e SANTOS, 2004).

COSTA et al. (1977) relataram o primeiro caso de toxoplasmose em um cão da raça Fox-hound, com 05 meses de idade, no município de Jaboticabal, SP, através de comprovação clínica, sorológica, histopatológica e isolamento do agente etiológico.

Taquizoítos ou cistos de bradizoítos podem ser detectados em tecidos de biópsia, ou durante a necropsia. As lesões microscópicas são características, e a presença de cistos permite o diagnóstico definitivo. Contudo, achados negativos não descartam a possibilidade de toxoplasmose (SWANGO et al., 1992).

O diagnóstico sorológico pode ser feito pela demonstração de título ascendente de anticorpos anti – *T. gondii* em soros pareados ou pela demonstração de elevado título sérico de anticorpos numa única amostra de soro, mas a não comprovação de título ascendente ou elevado não exclui o diagnóstico de toxoplasmose (LAPPIN, 2004).

Há vários testes sorológicos válidos, sendo os mais comuns a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), hemoaglutinação indireta (IHA), fixação de complemento, teste Sabin-Feldmann (“dye test”) e ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) (SIKES, 1982). DOMINGUES et al. (1998), em um estudo comparando os testes ELISA e RIFI, na detecção de anticorpos anti – *T. gondii* em 276 cães, observaram que o ELISA demonstrou maior sensibilidade do que a RIFI no imunodiagnóstico da toxoplasmose canina.

Estudos soroepidemiológicos em diferentes partes do mundo têm demonstrado que a infecção canina por *T. gondii* é bastante comum, com prevalência variando entre 20 a 91% (BJÖRKMAN et al., 1994; CABRAL et al., 1998). No Brasil, detectou-se soroprevalência muito variável e relativamente alta, principalmente em cães

mais velhos, habituados a comer carne crua e que vivem em meio rural (BRITO et al., 2002).

Anticorpos anti – *T. gondii* foram detectados, através da RIFI em 36,7% de cães saudáveis e em 54,2% de cães doentes, na Tchecoslováquia, entre 1981 e 1984, por SVOBODA et al. (1987).

ISHIZUKA et al. (1974 e 1981) examinando cães do município de São Paulo, verificaram que o sexo e a sazonalidade não interferem estatisticamente na proporção de reagentes, fato também observado por LANGONI et al. (2006). Tal resultado era esperado, baseando-se no conhecimento da epidemiologia da toxoplasmose, principalmente quanto aos mecanismos de aquisição da infecção, representada notadamente pelo carnivorismo (FRENKEL, 1973).

No Brasil, GERMANO et al. (1985), em Campinas, SP, observaram que 91% de 657 cães examinados eram positivos para toxoplasmose. SALATA et al. (1985), obtiveram soropositividade de 63,8% em 47 cães examinados em Botucatu, SP.

FREIRE et al. (1992) em 254 cães do município de Londrina, relataram 75,9% de soropositivos. GUIMARÃES et al. (1992) observaram que 43,7% de 243 cães examinados em Belo Horizonte, MG, mostraram-se positivos para *T. gondii*. O título 1:16 prevaleceu e 62% dos animais com idade superior a 05 anos estavam infectados.

BRITO et al. (2002) comprovaram que entre 80 cães com sintomatologia nervosa, atendidos na FMVZ-UNESP, em Botucatu, SP, 32% foram positivos para toxoplasmose. GIRALDI et al. (2002), notaram que entre um grupo de 67 cães com distúrbios neurológicos, 82,5% foram positivos e, um segundo grupo, formado por 31 animais com sinais neurológicos, 35,4% eram soropositivos.

MINEO et al. (2004) constataram que 30,3% de 369 cães, aparentemente sadios, de Uberlândia, MG, eram positivos para toxoplasmose e, LANGONI et al. (2006) observaram que entre 780 cães sadios, 33,1% eram positivos, em Botucatu, SP, não havendo diferença significativa entre sexo e idade dos animais.

Durante os últimos 15 anos, o diagnóstico de agentes infecciosos incluiu o uso de tecnologia que envolve os ácidos nucléicos, como a reação em cadeia de polimerase (PCR). A presença do parasito pode ser demonstrada através de seus componentes antigênicos ou de segmentos de DNA (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).

A combinação da detecção do anticorpo específico contra o *T. gondii* e do próprio microrganismo pela PCR no líquido cefalorraquidiano ou no humor aquoso é o modo mais preciso para diagnosticar toxoplasmose neurológica ou ocular, humana ou animal (LAPPIN, 2004).

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais importantes envolvendo pequenos animais. Em diversos países, têm sido descritas soroprevalências que variam de 15% a 85% na população humana (JAMES, 1996). No Brasil, a soroprevalência tem sido determinada entre 50% e 80% (CANTOS et al., 2000). Em Recife essa taxa é de 64% a 79% (COELHO et al., 2003); no Rio de Janeiro se observou uma soroprevalência de 79%; em Manaus, de 71%; em São Paulo, 68% e entre indígenas brasileiros, variou de 52% a 65% (AMENDOEIRA et al., 1999).

Estima-se que ocorra toxoplasmose congênita em 400 a 4000 recém-nascidos anualmente (LOPEZ et al., 2000; JONES et al., 2003). Infecção latente de toxoplasmose em humanos adultos também está associada a quadros de esquizofrenia, mudanças de personalidade e aumento do risco de acidentes de trânsito devido a reativação tardia do cisto com bradizoítos (FLEGR et al., 2000; FLEGR et al., 2002; TORREY e YOLKEN, 2003).

A infecção humana decorre da ingestão de cistos de bradizoítos na carne crua ou mal cozida ou ingestão de oocistos esporulados provenientes das fezes de gatos e cães contaminados (FRENKEL; PARKER, 1996; LAPPIN, 2004).

DAGUER et al. (2004) estudando a prevalência de anticorpos anti - *T. gondii* em bovinos e funcionários de matadouros do norte do Paraná, observaram que 41,4% dos animais eram soropositivos (IgG-RIFI) e 84,4% dos humanos apresentaram soropositividade (IgG-ELISA), sugerindo que a carne bovina possa desempenhar importante papel na manutenção da toxoplasmose, pela manipulação não higiênica da carne crua.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Verificar a existência de alterações histológicas nas estruturas que compõem o tecido nervoso da medula espinhal de cães assintomáticos, mas soropositivos para toxoplasmose, através do estudo das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal destes cães.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliação Morfológica

Analisar morfológicamente as estruturas da medula espinhal: citoplasma e núcleo de neurônios, células da neurógli (astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células endimárias), axônio, bainha de mielina axonal e presença de células de defesa da pia-máter.

3.2.2. Avaliação Morfométrica

Analisar:

- a) área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e fator de forma do citoplasma e núcleo dos neurônios.
- b) espessura da bainha de mielina axonal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para os objetivos propostos foram utilizados vinte cães sem raça definida, adultos, com peso entre 7 e 15 kg, sendo dez cães hígidos, com sorologia negativa para toxoplasmose, utilizados como controle (grupo 1) e dez cães com titulações para toxoplasmose superior a 1:256, mediante o teste ELISA (IgG), utilizados como grupo reagente (grupo 2). Dentre os animais do grupo 2, 6 cães apresentaram sorologia superior a 1:1024.

Os animais foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da prefeitura de Araraquara, SP.

4.2. Procedimento experimental

A sorologia para toxoplasmose foi realizada junto ao Departamento de Patologia Animal da FCAV-UNESP, pelo teste ELISA para IgG, método desenvolvido e padronizado no próprio departamento.

Após a constatação dos animais com sorologia superior a 1:256, fragmentos da medula espinhal correspondentes às regiões cervical, torácica e lombar foram coletados e fixados em solução de Bouin por 24 horas e processados, rotineiramente, para inclusão em parafina.

Após microtomia semi-seriada, à espessura de 5 micrômetros (μm), os cortes histológicos foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-eosina (HE) (anexo I) e do tricromo de Masson (TM) (anexo II). Cortes com espessura de 15 μm foram corados através da Impregnação pela prata (anexo III A e B). As três técnicas foram realizadas segundo TOLOSA (2003). Cortes, também com espessura de 5 μm , foram corados pelo método imunoenzimático indireto da Peroxidase Antiperoxidase (PAP) (anexo IV),

segundo LEMOS (1995). As lâminas foram analisadas à microscopia de luz para verificar a morfologia e morfometria das estruturas e fotografadas em um fotomicroscópio modelo Olympus BX50.

4.3.Procedimentos morfológicos

As estruturas histológicas observadas foram: neurônios (citoplasma e núcleo), células da neurógliia (astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células endimárias), axônio, bainha de mielina e células de defesa da pia-máter.

4.4.Procedimentos morfométricos

O estudo morfométrico foi realizado no citoplasma e núcleo dos neurônios e na bainha de mielina dos axônios. Os parâmetros analisados foram: área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e fator de forma do citoplasma e núcleo dos neurônios. Foi também avaliada a espessura da bainha de mielina. A determinação, em micrômetros (µm), dos parâmetros celulares e da bainha de mielina, foi feita mediante o sistema analisador de imagens, Image Pro-plus, acoplado a um microscópio binocular, ambos da Carl Zeiss.

O fator de forma é expresso pela seguinte fórmula matemática, que está programada no analisador de imagens:

$$\frac{(\text{perímetro})^2}{(4 \cdot \pi \cdot \text{área})}$$

Este fator é calculado, indiretamente, a partir do perímetro do círculo, com a equação $2 \cdot \pi \cdot R$. pela substituição da área e do perímetro² obtendo-se:

$$\frac{(2 \cdot \pi \cdot R)^2}{4 \cdot \pi (\pi \cdot R)^2} = \frac{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)}{(4 \cdot \pi \cdot \pi \cdot R^2)} = \frac{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)}{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)} = 1,0.$$

O menor valor deste fator é igual a um, significando que a forma do citoplasma e/ou núcleo se assemelha à forma de um círculo. Quando este fator for maior que a unidade, entende-se que a forma da estrutura não é circular.

4.5. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada mediante o teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), através do Programa de Análise Estatística SAS.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação Morfológica

5.1.1. Características morfológicas dos neurônios das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal

As características morfológicas dos neurônios das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal de cães, expressaram semelhança entre estes segmentos quando comparados os grupos 1 e 2. Pela coloração com hematoxilina-eosina, o núcleo mostrou-se basófilo e o citoplasma acidófilo (Fig. 01 – A, C, D), enquanto que, pela coloração com tricromo de Masson, evidenciou-se núcleo acidófilo e citoplasma basófilo (Fig. 01 – E e F).

As fotomicrografias destas células revelaram, nas diferentes regiões, citoplasma com acúmulo de grânulos intensamente basófilos (Fig. 01 – B), distribuídos no pericário e dendritos, denominados corpúsculos de Nissl, que correspondem ao retículo endoplasmático rugoso, organela rica em polirribossomos que lhe conferem basofilia, dando uma aparência tigróide ao citoplasma.

O pericário também evidenciou prolongamentos citoplasmáticos irregulares, conferindo uma grande variação na forma e tamanho destas células em ambos os grupos (Fig. 01 – C e D).

Com relação ao núcleo dos neurônios, observou-se que este, geralmente, é grande, esférico ou ovóide, pouco corado, com cromatina frouxa e um ou mais nucléolos evidentes, estando localizado no centro do corpo celular (Fig. 01 – A a F).

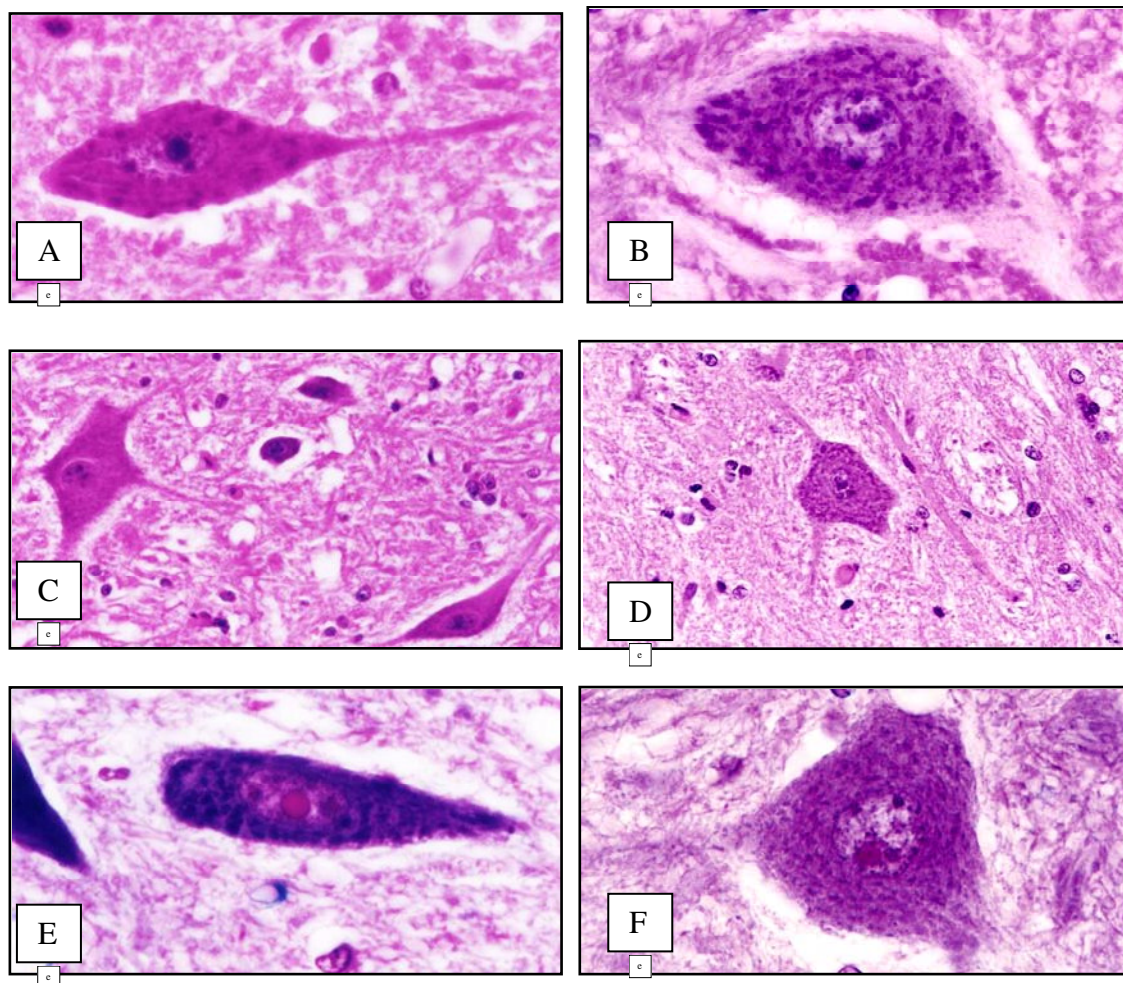


Figura 01 – Fotomicrografias de neurônios de cães, nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal:

A) neurônio com citoplasma acidófilo e núcleo basófilo (grupo 1, região cervical, HE,100X).

B) corpúsculos de Nissl no citoplasma acidófilo do neurônio (grupo 2, região cervical, HE,100X).

C) neurônio com diferentes tamanhos e formas (grupo 1, região torácica, HE, 40X).

D) prolongamentos de neurônio (grupo 2, região torácica, HE,40X).

E) neurônio com citoplasma basófilo e núcleo acidófilo (grupo 1, região lombar, HE,100X).

F) neurônio (grupo 2, região lombar, HE,100X).

5.1.2. Características morfológicas dos axônios e bainha de mielina das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal

O corte transversal da substância branca da medula espinhal revelou axônios com diferentes calibres, envoltos pela bainha de mielina, cuja espessura variou, proporcionalmente, ao diâmetro axonal. Este complexo evidenciou-se com imagem negativa, em decorrência dos componentes lipídicos serem extraídos durante a rotina histológica, permanecendo apenas os resquícios da trama protéica, conferindo um aspecto circular à bainha de mielina (Fig. 02 – A a F). Não se constatou diferenças morfológicas entre os grupos controle e reagente, nos diferentes segmentos estudados.

5.1.3. Características morfológicas das células da neurógliia das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal

Com relação às características morfológicas da neurógliia, observou-se semelhanças entre os grupos estudados, nos três segmentos da medula espinhal.

Os cortes histológicos, impregnados pela prata, apresentaram a micrógliia com corpo alongado e pequeno, características observadas nas substâncias branca e cinzenta da medula espinhal (Fig. 03 – A, B, C, e D), o que facilitou na diferenciação entre outras células da neurógliia por possuírem núcleo esférico, estando invisíveis o núcleo e os prolongamentos citoplasmáticos.

A oligodendróglia revelou, pelo método de impregnação pela prata, corpo celular arredondado (Fig. 03 – A, B, E, e F), estando o núcleo e os prolongamentos celulares não visíveis, sendo que estas observações foram semelhantes nas substâncias branca e cinzenta dos segmentos citados da medula espinhal de cães dos dois grupos.

A morfologia dos astrócitos, revelada pelo método indireto da Peroxidase Antiperoxidase (PAP), foi característica e facilmente visualizada pela coloração

marrom de seu citoplasma. Os astrócitos localizados na substância branca, denominados fibrosos, apresentaram prolongamentos longos e menos ramificados (Fig. 04 - A e B), e os astrócitos protoplasmáticos, localizados na substância cinzenta, demonstraram prolongamentos curtos e abundantes (Fig. 04 - C e D).

As células ependimárias, das regiões estudadas da medula espinhal dos cães, apresentaram-se em arranjo epitelial simples, com células cilíndricas ciliadas, em ambos os grupos (Fig. 04 – E e F).

5.1.4. Características morfológicas das células de defesa da pia-máter das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal

Dentre as células de defesa imunológica, observou-se, neutrófilos segmentados, os quais constituem a primeira linha de defesa orgânica. Não se observou aumento do número ou alteração nas células de defesa entre os dois grupos estudados (Fig. 04 – G e H).

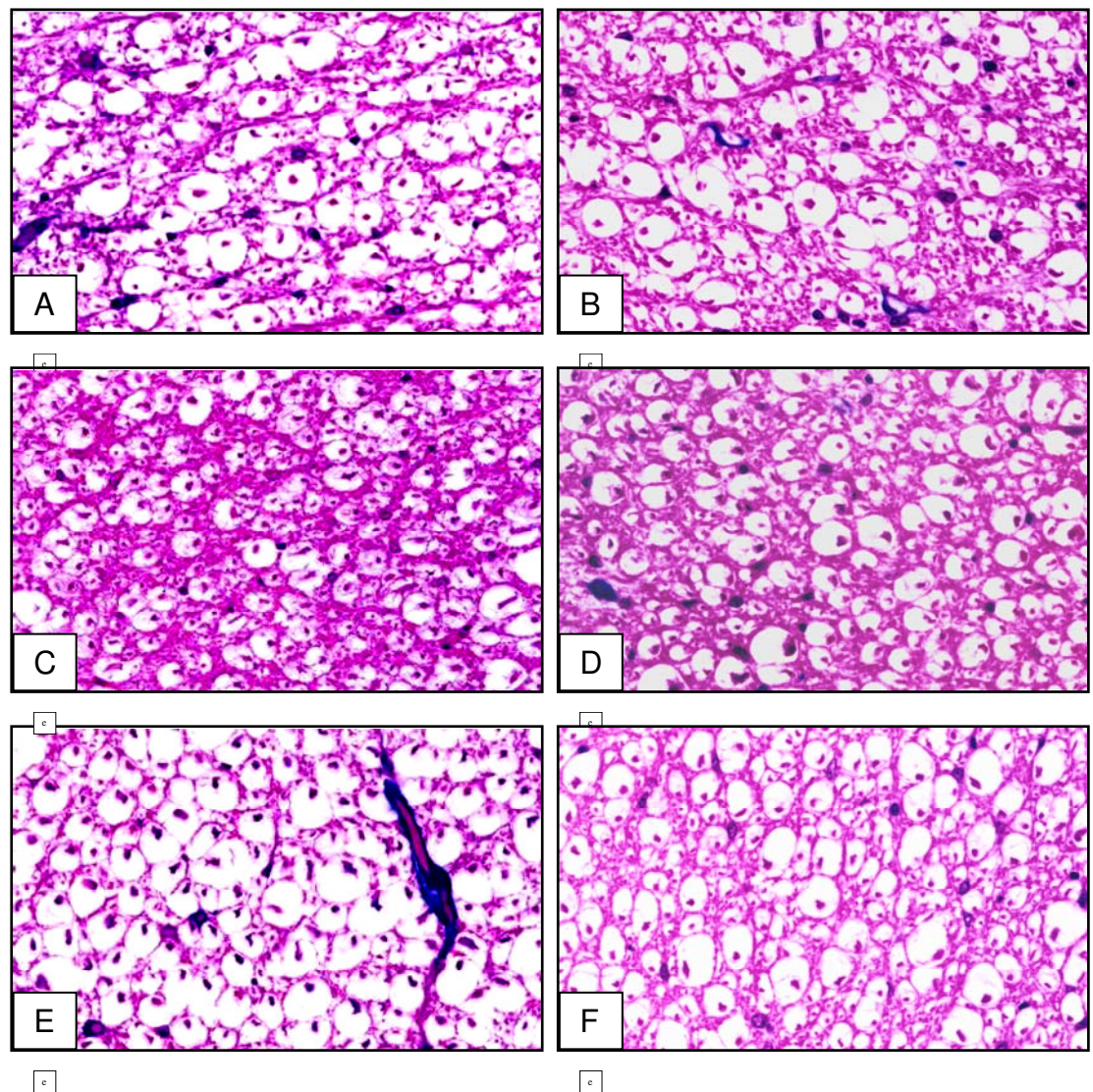


Figura 02 – Fotomicrografias de axônios com bainha de mielina de cães negativos e cães positivos para toxoplasmose, nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal:

- A) axônio com bainha de mielina de animal negativo localizado na região cervical (TM,40X).
- B) axônio com bainha de mielina de animal positivo localizado na região cervical (TM,40X).
- C) axônio com bainha de mielina de animal negativo localizado na região torácica (TM,40X).
- D) axônio com bainha de mielina de animal positivo localizado na região torácica (TM,40X).
- E) axônio com bainha de mielina de animal negativo localizado na região lombar (TM,40X).
- F) axônio com bainha de mielina de animal positivo localizado na região lombar (TM,40X).

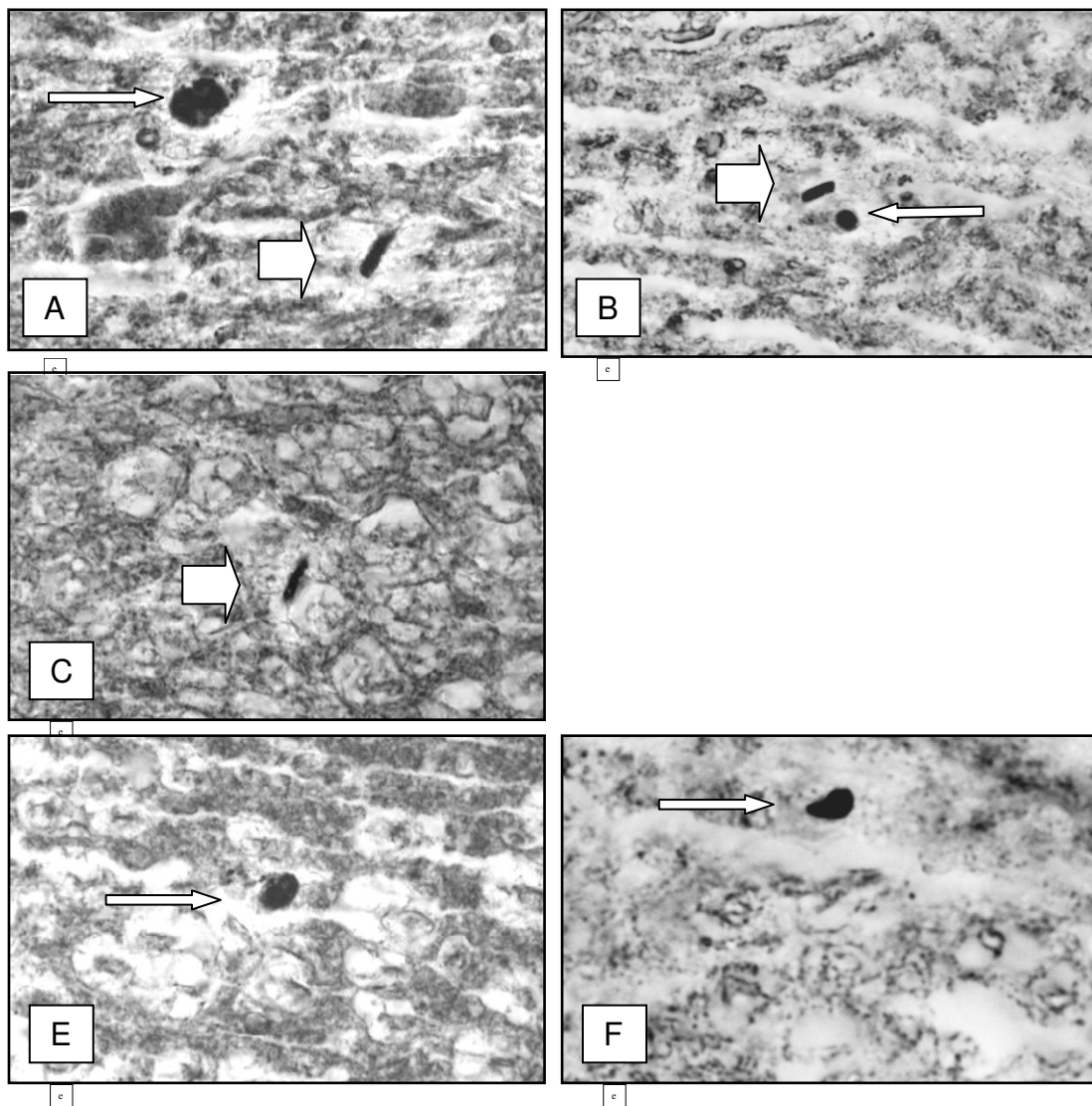


Figura 03 – Fotomicrografias de células da neurógli de cães negativos e cães positivos para toxoplasmose, nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal:

- A) oligodendróglia (seta fina) e micróglia (seta larga) localizadas na substância cinzenta da medula espinhal de animal negativo (Impregnação pela prata,40X).
- B) oligodendróglia (seta fina) e micróglia (seta larga) localizadas na substância cinzenta da medula espinhal de animal positivo (Impregnação pela prata,40X).
- C) micróglia (seta grossa) localizada na substância branca de animal negativo (Impregnação pela prata,40X).
- D)
- E) oligodendróglia (seta fina) localizada na substância branca de animal negativo (Impregnação pela prata,40X).
- F) oligodendróglia (seta fina) localizada na substância branca de animal positivo (Impregnação pela prata,40X).

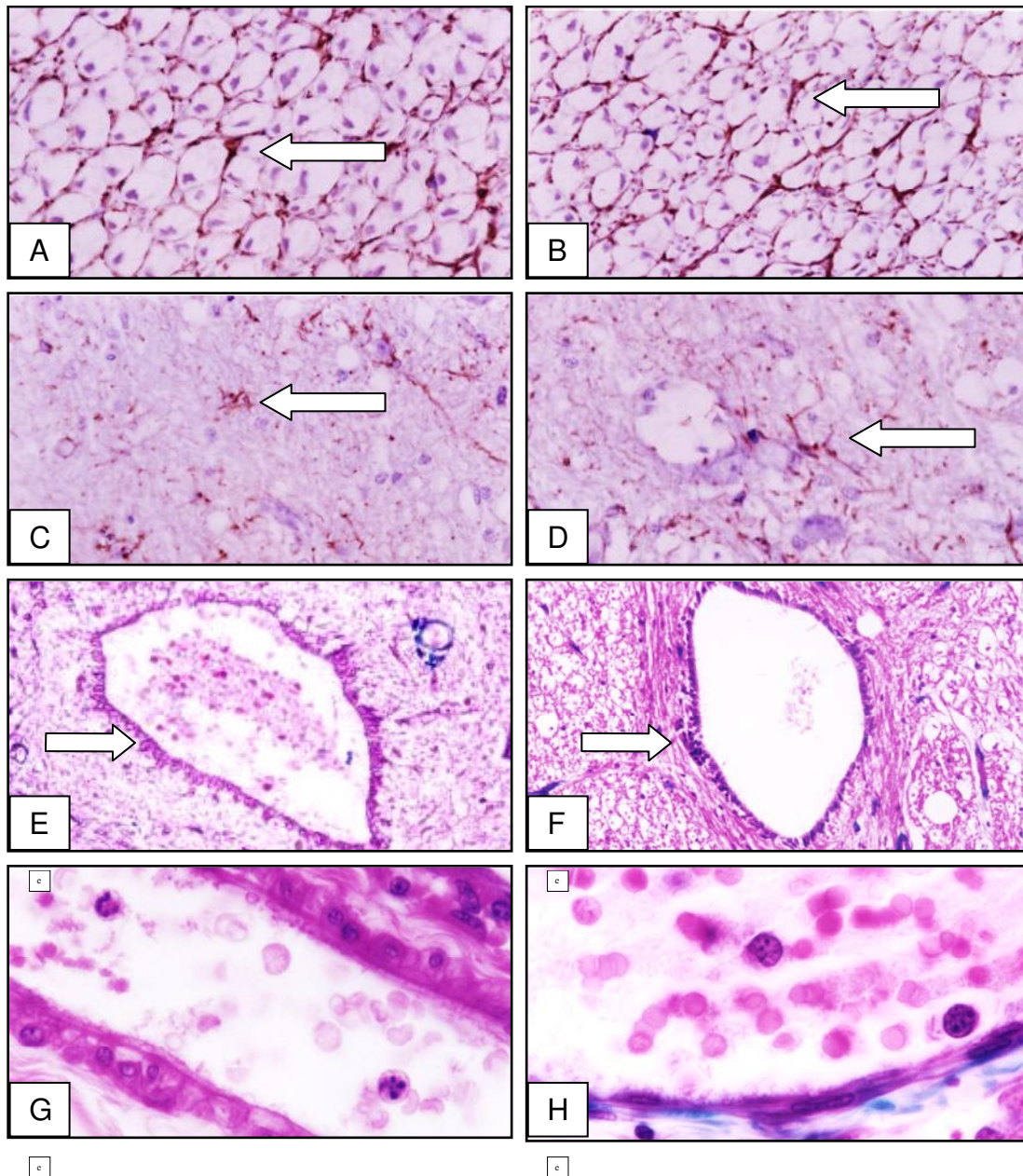


Figura 04 – Fotomicrografias de células da neuróglia de cães negativos e cães positivos para toxoplasmose, nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal:

- A) astrócito fibroso (seta) localizado na substância branca da medula espinhal de animal negativo (PAP, 40X).
- B) astrócito fibroso (seta) localizado na substância branca da medula espinhal de animal positivo (PAP, 40X).
- C) astrócito (seta) localizado na substância cinzenta da medula espinhal de animal negativo (PAP, 40X).
- D) astrócito (seta) localizado na substância cinzenta da medula espinhal de animal positivo (PAP, 40X).
- E) células ependimárias (seta) no canal ependimário da medula espinhal de animal negativo (TM, 20X).
- F) células ependimárias (seta) no canal ependimário da medula espinhal de animal positivo (TM, 20X).
- G) células de defesa (neutrófilos) em vaso sangüíneo da pia-máter da medula espinhal de animal negativo (HE, 100X).
- H) células de defesa (neutrófilos) em vaso sangüíneo da pia-máter da medula espinhal de animal positivo (TM, 100X).

5.2. Avaliação Morfométrica

5.2.1. Morfometria dos parâmetros do citoplasma e do núcleo dos neurônios das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal

Para cada parâmetro analisado, mediu-se 30 neurônios, em cada região, por animal, totalizando 300 neurônios por região da medula espinhal.

O valor médio da área, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, perímetro e fator de forma, do citoplasma e núcleo de neurônios, bem como o desvio padrão destes parâmetros das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal de cães, estão relacionados, respectivamente, nas tabelas 01 a 05.

5.2.1.1. Área do citoplasma e núcleo de neurônios

Analisando-se a área da região cervical, não notou-se diferença significativa ($p > 0,05$), para o citoplasma e o núcleo de neurônios, entre os dois grupos. Entretanto, os valores médios das áreas das regiões torácica e lombar revelaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, tanto para o citoplasma como para o núcleo dos neurônios, sendo que o grupo 2 apresentou os maiores valores para este parâmetro, nestas regiões, como indicado na tabela 01.

Tabela 1 – Comparação entre as médias (μm^2) da variável área do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.

	CITOPLASMA					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	288,15 a	55,81	262,69 a	38,76	641,01 a	212,94
GRUPO 2	317,97 a	122,56	512,03 b	187,71	982,35 b	160,94
	NÚCLEO					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	79,62 a	6,66	73,90 a	9,56	106,25 a	14,43
GRUPO 2	70,31 a	23,21	94,70 b	34,21	174,08 b	38,83

DP – desvio padrão

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste t de Student ($p > 0,05$).

5.2.1.2. Diâmetro máximo do citoplasma e núcleo de neurônios

No diâmetro máximo observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para o núcleo da região cervical e citoplasma da região torácica, sendo os maiores valores médios encontrados para o grupo 2. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para os valores médios do citoplasma da região cervical, núcleo da região torácica, como também, citoplasma e núcleo da região lombar, entre os grupos, para este parâmetro (tabela 02).

Tabela 2 – Comparação entre as médias (μm) da variável diâmetro máximo do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.

	CITOPLASMA					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	46,52 a	4,81	40,25 a	4,76	56,75 a	6,99
GRUPO 2	41,54 a	4,95	48,17 b	5,69	59,53 a	5,60
	NÚCLEO					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	15,19 a	1,15	14,22 a	1,43	16,25 a	1,07
GRUPO 2	12,85 b	1,23	14,55 a	1,03	17,46 a	1,32

DP – desvio padrão

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste t de Student ($p > 0,05$).

5.2.1.3. Diâmetro mínimo do citoplasma e núcleo de neurônios

No diâmetro mínimo notou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as regiões torácica e lombar, tanto para os valores médios do citoplasma como para os valores do núcleo dos neurônios, sendo encontrados os maiores valores para o grupo 2. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$), entre os grupos, para os valores do citoplasma e núcleo da região cervical (tabela 03).

Tabela 3 – Comparação entre as médias (μm) da variável diâmetro mínimo do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.

	CITOPLASMA					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	11,83 a	1,25	11,62 a	0,95	19,32 a	3,82
GRUPO 2	12,82 a	2,93	17,19 b	4,54	27,08 b	4,14
	NÚCLEO					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	6,05 a	0,54	5,84 a	0,38	7,59 a	0,74
GRUPO 2	6,19 a	1,69	7,57 b	2,31	11,86 b	1,94

DP – desvio padrão

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste t de Student ($p > 0,05$).

5.2.1.4. Perímetro do citoplasma e núcleo de neurônios

Não se observou diferença significativa ($p>0,05$), entre os grupos, para os valores médios do citoplasma da região cervical e núcleo da região torácica. Mas, ocorreu diferença significativa ($p<0,05$), entre os grupos, para os valores do núcleo da região cervical, citoplasma da região torácica, bem como, citoplasma e núcleo da região lombar (tabela 04).

Tabela 4 – Comparação entre as médias (μm) da variável perímetro do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.

	CITOPLASMA					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	133,92 a	12,92	113,18 a	12,04	160,36 a	21,36
GRUPO 2	120,92 a	16,82	138,74 b	22,33	180,31 b	20,73
	NÚCLEO					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	36,66 a	1,61	34,51 a	3,00	40,48 a	2,79
GRUPO 2	32,16 b	4,09	36,96 a	4,76	48,54 b	5,21

DP – desvio padrão

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste t de Student ($p>0,05$).

5.2.1.5. Fator de forma do citoplasma e núcleo de neurônios

No fator de forma notou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as três regiões, tanto para o citoplasma como para o núcleo dos neurônios, onde os maiores valores médios foram encontrados no grupo 2, indicando que os neurônios destes animais possuem forma mais arredondado do que os neurônios do grupo 1 (tabela 05).

Tabela 5 – Comparação entre as médias da variável fator de forma do citoplasma e núcleo de neurônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.

	CITOPLASMA					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	5,55 a	1,27	4,34 a	0,55	3,54 a	0,62
GRUPO 2	4,23 b	0,83	3,36 b	0,43	2,82 b	0,62
	NÚCLEO					
	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	1,40 a	0,12	1,35 a	0,08	1,27 a	0,04
GRUPO 2	1,27 b	0,09	1,25 a	0,13	1,13 b	0,06

DP – desvio padrão

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste t de Student ($p > 0,05$).

5.2.2. Morfometria da bainha de mielina axonal da substância branca, em corte transversal, das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal

Com relação à espessura da bainha de mielina dos axônios da substância branca da medula espinhal não observou-se diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos, sendo os maiores valores médios encontrados para a região lombar e os menores valores para a região cervical (tabela 06).

Tabela 6 – Comparação entre as médias (μm) da espessura da bainha de mielina de axônios de animais negativos (grupo 1) e animais soropositivos (grupo 2), nas regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal.

	CERVICAL		TORÁCICA		LOMBAR	
	média	DP	média	DP	média	DP
GRUPO 1	5,72 a	1,93	6,53 a	2,41	7,41 a	3,18
GRUPO 2	5,71 a	1,95	6,76 a	2,24	8,04 a	2,78

DP – desvio padrão

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste t de Student ($p>0,05$).

6. DISCUSSÃO

As características morfológicas dos neurônios das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal de cães reagentes para toxoplasmose ficaram preservadas, se assemelhando às características dos neurônios do grupo controle. Os resultados deste estudo referentes a forma do citoplasma, quantidade de prolongamentos citoplasmáticos, número de nucléolos visíveis e padrão de cromatina destas células, se incluíram, de maneira geral, nos relatos de GEORGE e CASTRO (1998), YOUNG e HEATH (2001), MACHADO (2002) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004).

Em conformidade com JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004), evidenciou-se, pela coloração com Tricromo de Masson, núcleo acidófilo e citoplasma basófilo, enquanto que na coloração pela Hematoxilina-eosina, o núcleo mostrou-se basófilo e o citoplasma acidófilo. Em consonância com ROSS et al. (1995), YOUNG e HEATH (2001), MACHADO (2002) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004), observou-se citoplasma com acúmulo de grânulos intensamente basófilos, distribuídos no pericário e dendritos porém, ausentes no axônio e no seu cone de implantação.

Quanto à forma do citoplasma e do núcleo dos neurônios, os achados desta pesquisa concordam com BREAZILE (1982), BANKS (1992), GEORGE e CASTRO (1998), MACHADO (2002) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004), ao revelarem corpo celular com formato bastante variável (esférico, ovóide, piramidal, fusiforme, estrelado ou em forma de lua crescente) e núcleo grande, esférico, pouco corado, com cromatina frouxa e um ou mais nucléolos evidentes.

Os prolongamentos citoplasmáticos, dendritos e axônio, visíveis neste estudo ocorreram nos neurônios maiores, de acordo com MACHADO (2002) ao citar que as técnicas histológicas de rotina mostram apenas o corpo neuronal e, nos neurônios maiores, as porções iniciais de seus prolongamentos.

Com referência às células da neurógliã, estas estavam presentes em ambos os grupos estudados, sendo que a morfologia destas se manteve inalterada e com aspecto semelhante nos dois grupos.

As observações sobre os astrócitos relembram os relatos de HIRANO (1985), MACHADO (2002) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004), ao reconhecerem dois tipos morfológicos principais desta célula: protoplasmático e fibroso. Concorde-se, outrossim, com LANTOS (1990), ROSS et al. (1995), MACHADO (2002) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004), ao descreverem que, a distinção entre os dois tipos celulares baseia-se na localização celular e no número de prolongamentos citoplasmáticos, sendo que os astrócitos protoplasmáticos se encontram na substância cinzenta e apresentam prolongamentos espessos e curtos, com ramificação profusa e os astrócitos fibrosos, localizados na substância branca, evidenciam prolongamentos finos e longos com ramificação mais escassa.

Ainda, com relação ao astrócitos protoplasmáticos, notou-se uma morfologia mais delicada em confronto ao fibroso, harmonizando-se com a descrição de HIRANO (1985).

As evidências sobre a oligodendróglia e micróglia se assemelham às ilustrações de DI FIORE et al. (1982) ao mencionarem, mediante o método de impregnação pela prata, ser o corpo celular da oligodendróglia arredondado, característica básica, para a diferenciação da micróglia, cujo corpo celular se mostra alongado e pequeno.

As células ependimárias apresentaram-se em arranjo epitelial simples, com células cilíndricas e ciliadas, vindo ao encontro das narrações de GEORGE e CASTRO (1998), MACHADO (2002) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004).

Neste estudo sobre as características morfológicas da bainha de mielina e do axônio, ao corte transversal, notou-se que não houve degeneração destas estruturas nos animais reagentes para toxoplasmose.

Comparando-se as evidências desta pesquisa com as mencionadas na literatura por DI FIORE et al. (1982), YOUNG e HEATH (2001) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004), verifica-se semelhança entre as descrições destas características. Estes autores também relataram que, ao corte transversal da substância branca da

medula espinhal, o axônio apresentou-se com diferentes calibres, envolvido pela bainha de mielina, um complexo lipoprotéico, cuja espessura é proporcional ao diâmetro axonal.

Mediante estas informações, relembra-se CHRISMAN (1997) e YOUNG e HEATH (2001), ao exporem que a velocidade de condução do potencial de ação é proporcional ao diâmetro do axônio, sendo que a mielinização aumenta, sensivelmente, a velocidade de condução do axônio. Desta forma, entende-se como os mamíferos utilizam, rapidamente, a musculatura estriada esquelética para um imediato deslocamento corporal, em decorrência à chegada do estímulo nervoso na placa motora, pela liberação de neurotransmissores no telodendro, de um axônio de grande calibre.

Quanto às células de defesa da pia-máter, membrana conjuntiva intimamente aderida ao sistema nervoso central, encontrou-se, na maioria, neutrófilos segmentados, por constituírem a primeira linha de defesa orgânica, que também, conforme as citações de JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004) inclui linfócitos, macrófagos, plasmócitos, mastócitos e eosinófilos. Imagina-se que a presença destas células nesta membrana seja um fator normal, possibilitando, se for necessário, uma rápida defesa celular contra microrganismos. Ao contrário do que se supunha, não foi constatado um aumento do aporte destas células de defesa no caso dos animais reagentes, demonstrando que nesses cães assintomáticos não se desencadeou uma resposta de defesa celular do tecido conjuntivo.

No que diz respeito aos parâmetros morfométricos do citoplasma e do núcleo dos neurônios das regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal de cães, os resultados obtidos, ao expressarem os maiores valores médios para a área, perímetro, diâmetro máximo e diâmetro mínimo para o segmento lombar, induziram-nos, com respaldo em BREAZILE (1982), YOUNG e HEATH (2001) e CARVALHO et al. (2006), a aventar a hipótese de que há grandes neurônios motores inferiores, cujos terminais axônicos inervam os membros pélvicos.

Os corpos celulares destes neurônios motores inferiores se encontram no corno ventral da substância cinzenta da medula espinhal, concentrando-se na intumescência lombar (BREAZILE, 1982; CHRISMAN, 1997; MOLENAAR et al., 1997),

conferindo boa inervação para os grandes grupos musculares estriados esqueléticos, responsáveis pela força impulsora, essencial para a movimentação animal.

Também se pode constatar, neste estudo, que os neurônios dos animais reagentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos neurônios dos cães controle, possuindo valores médios maiores, sugerindo que estes neurônios possam estar sofrendo processo de edema, tornando a célula maior, devido à presença do parasita dentro do neurônio, como citado por SUMMERS et al. (1995) e GIRALDI et al. (2002), em cães com toxoplasmose crônica com sinais neurológicos, apesar que as alterações histopatológicas mais comuns no SNC serem caracterizadas por manguitos perivasculares associados à vasculite, necrose, malácia e gliose focal (DUBEY e BEATTLE, 1988; GIROLAMI et al., 1994; DUBEY e LAPPIN, 1998; GIRALDI et al., 2002).

Com relação aos valores médios observados para o fator de forma do citoplasma e do núcleo dos neurônios da substância cinzenta da medula espinhal, evidenciou-se formato mais arredondado nos neurônios localizados na região lombar, pois apresentaram o menor valor médio para este parâmetro. Contrariamente, a região cervical mostrou neurônios com formato mais irregular, os quais possuíram o maior valor médio.

Por estes achados supõe-se, com apoio em BANKS (1992), MOLENAAR et al. (1997), GEORGE e CASTRO (1998) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004), que tal regularidade é devida à menor presença de dendritos no corpo celular do neurônio motor, quando comparado ao neurônio sensorial que, em consequência dos numerosos prolongamentos, dendritos, que se originam do corpo celular, apresenta irregularidade no seu contorno.

Também se notou que os neurônios dos animais reagentes possuíram os menores valores médios, evidência atribuída ao possível edema celular que conferiu à estas células formato mais arredondado, permitindo, assim, conjecturar que estes neurônios perderam o formato estrelado característico, pois, com respaldo em SUMMERS et al. (1995), na toxoplasmose crônica ocorrem áreas com descoloração e edema celular, bem como, perda da divisão entre substância cinzenta e branca.

Com alusão aos valores médios encontrados para a bainha de mielina dos axônios da substância branca da medula espinhal, confirmou-se que, na região lombar, ocorreram os maiores axônios e, por consequência, o maior valor médio para a espessura da bainha de mielina, que é proporcional ao diâmetro axonal.

Dessa forma presume-se, com base em CHRISMAN (1997), MOLENAAR et al. (1997) e CARVALHO et al. (2006), que, provavelmente, neste segmento, se faz necessária uma rápida condução do impulso nervoso (condução saltatória), iniciando contração muscular e gerando a força motriz impulsora, imprescindível para o deslocamento corporal.

Não foi constatado diferenças significativas, nas espessuras da bainha de mielina das regiões estudadas, entre os grupos, indicando que os cães reagentes não apresentaram alterações na bainha de mielina quando comparados aos cães controle.

7. CONCLUSÃO

Os resultados morfológicos indicam que não houve alteração morfológica visível, pela microscopia de luz, nos neurônios dos animais reagentes para toxoplasmose, e clinicamente assintomáticos, naquela ocasião. Também revelaram que a morfologia da neuróglio, bainha de mielina e axônio destes cães se manteve preservada, não sofrendo nenhum tipo de degeneração. Constatou-se, outrossim, que o *T. gondii* não estimulou as células de defesa da pia-máter.

Os resultados morfométricos demonstram que os neurônios dos animais reagentes para toxoplasmose possuem valores médios maiores do que os do grupo controle, para todos os parâmetros estudados, exceto para o fator de forma cujos valores encontrados foram menores, indicando que há alteração no tamanho e estrutura destas células, ocorrendo aumento e perda do formato estrelado destes neurônios, nestes animais, provavelmente devido a um processo de edema celular. Estes resultados sugerem que outras investigações deverão ser feitas para se comprovar a hipótese de que os neurônios destes cães, ainda assintomáticos, perderam a função condutora.

8. REFERÊNCIAS

AMENDOEIRA, M. R. R.; COSTA, T.; SPALDING, S. M. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (APicomplexa: Sarcocystidae) e a toxoplasmose. **Rev. Souza Marques**, Rio de Janeiro, v. 1, n.1, p. 15-35, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR-6023: Informação e documentação – referências-elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

AVERILL, D.R.; LAHUNTA, A. Toxoplasmosis of the Canine Nervous System: Clinicopathological Findings in Four Cases. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 159, p. 1134-1141, 1971.

BANKS, W. J. Tecido Nervoso. In:_____ **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo : Manole, 1992. 629p.

BJORKMAN, C.; LUNDEN, A.; UGGLA, A. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish dogs. **Acta. Vet. Scand.**, Vanlose, v. 35, p. 445-447, 1994.

BRAUND, K.G.; BLAGBURN, B.L.; TOIVIO-KINNUCAN, M.; AMLING, K.A.; PIDGEON, G.L. *Toxoplasma* polymyositis/polyneuropathy – a new clinical variant in two mature dogs. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Golden, v. 24, n. 1, p. 93-97, 1988.

BREAZILE, J.E. O tecido nervoso. In: DULLMANN, H.D. et al. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397p.

BRESCIANI, K.D.S. **Toxoplasmose experimental em cadelas gestantes**. 1997. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; TONIOLLO, G. H.; SABATINI, G. A.; MORAES, F. R.; PAULILLO, A. C.; FERRAUDO, A. C. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 143-145, 1999.

BRESCIANI, K. D. S.; TONIOLLO, G. H.; COSTA, A. J.; SABATINI, G. A.; MORAES, F. R. Clinical, parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p.1039-1043, 2001.

BRIGTMAM, M. Implication of astroglia in the blood-brain barrir. In: ABBOTT, N.j. Glial-neuronal interactions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 633, p. 343-347, 1991.

BRITO, A. F.; SOUZA, L. C.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1-5, 2002.

BUTT, A. M. Macrogial cell types, lineage, and morphology in the CNS. In: ABBOTT, N.J. Glial-neuronal interactions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 633, p. 90-95, 1991.

CABRAL, D. D.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. Frequency of anti-*toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Uberlândia – MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.7, p. 87-90,1998.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 6, n.3, p. 117-118, 1964.

CANTOS, G. A. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Rev. Assoc. Med. Brasil**, v.46, n.4, p. 335-341, 2000.

CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, Paris, v. 4, p. 518-519, 1911.

CARINI, A.; MACIEL, J. Toxoplasmose naturelle du chien. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, Paris, v. 6, p. 681-68, 1913.

CARVALHO, A. C. F.; PACHECO, M. R.; BARALDI-ARTONI, S. M.; MATEUS, O. Canine spinal cord neuron and axon myelin sheath morphometry. **Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med.** Berlin, v.35, n.5, p. 284-286, 2006.

CASTRO, A.F.P.; CALDAS, A.D.; ROSA, C.A.S.; MELLO, D.; QUEIROZ, J. C. Isolamento de *Toxoplasma gondii* de cão e observação sobre casos clínicos. **Biológico**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 46-50, 1962.

CHRISMAN, C.L. Introdução ao Sistema Nervoso. In:_____ **Neurologia dos pequenos animais**, São Paulo: Roca, 1997, 432p.

COELHO, R. A.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO, L. B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 229-231, 2003.

CONRAD, P. A.; MILLER, M. A.; KREUDER, C. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **Intern. J. Parasitol.**, v. 35, p.1155-1168, 2005.

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.**, Lawrence, v. 6, n. 2, p. 212-218, 1977.

COSTA, A. J. **Toxoplasmose congênita natural em bovinos e infecção experimental de vacas gestantes com oocistos de *Toxoplasma gondii* (NICOLLE &**

MANCEAUX, 1908). 1979. 88 f. Tese (Doutorado em Ciencias) – Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; VIRMOND, M. P.; HAMANN, W.; AMENDOEIRA, M. R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1133-1137, 2004.

DAVIDSON, M. G. Toxoplasmosis. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 30, n.5, p. 1051-1062, 2000.

DEANE, M.P.; SOGORB, F.; JAMRA, L.F.; GUIMARÃES, E.C. On the gametogenic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 110-113, 1971.

DI FIORE, M.S.H.; MANCINI, R.E.; DE ROBERTIS, E.D.P. Tecido Nervoso. In: _____ **Novo atlas de histologia**, 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 335p.

DOMINGUES, L.M.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI COSTA, M.; CARVALHO, C. S.; COSTA, A J.; MALHEIROS, E. B. Canine toxoplasmosis: a comparative evaluation of the detection of anti-*toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (elisa) and the indirect immunofluorescence reaction (IFF). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.7, n.2, p. 79-85, 1998.

DUBEY, J.P.; SWAN, G.V.; FRENKEL, J.K.A. Simplified method for isolation of *T. gondii* from the feces of cats. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 58, n. 5, p. 1055-1056, 1972.

DUBEY, J.P.; BEATTLE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. 220p.

DUBEY, J.P.; KOESTNER, A.; PIPER, R.C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 197, n. 7, p. 857-860, 1990.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 1998. cap. 80, p. 493-509.

DUBEY, J. P.; HILL, D. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.8, p. 63-64, 2002.

EHRENSPERGER, F.; POSPISCHIL, A Spontaneous mixed infection with distemper virus and *Toxoplasma* in dogs. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, Hannover, v. 96, n.4, p. 184-186, 1989.

ENG, L.F.; YU, A C. H.; LEE, Y.L. Astrocyte response to injury. In: YU, A C.H. et al. **Prog. Brain Res.**, Amsterdam, v. 94, p. 353-365, 1992.

FEDOROFF, S. Prenatal ontogenesis of astrocytes. In: FEDOROFF, S.; VERNADAKIS, A. **Astrocytes**: development, morphology and regional specialization of astrocytes. Orlando: Academic Press, 1986. p. 35-74.

FLEGR, J.; KODYM, P.; TOLAROVA, V. Correlation of duration of latent *Toxoplasma gondii* infection with personality changes in women. **Biol. Psychol.**, v.53, p. 57-68, 2000.

FLEGR, J.; HAVLICEK, J.; KODYM, P.; MALY, M.; SMAHEL, Z. Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study. **BMC Infect. Dis.**, v.2, n.11, 2002 Disponível em: <[http:// www.biomedcentral.com/ 1471-2334/2/11.pdf](http://www.biomedcentral.com/1471-2334/2/11.pdf)>. Acesso em 20 jul. 2006.

FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E. A.; VIANNA, C. C. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães atendidos no Hospital Veterinário da EUL-PR. **Sem. Cienc. Agr.**, Londrina, v.13, p. 65-69, 1992.

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

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: HAMMOND, D.M.; LONG, P.L. **The coccidia- eimeria, isospora, toxoplasma and related genera**. London: University Park Press, 1973. p. 343-410.

FRENKEL, J. K.; HASSANEIN, K. M.; HASSANEIN, R. S. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.53, p. 458-468, 1995.

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

GENNARI, S. M.; CANON-FRANCO, W. A.; YAI, L. E. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 26, n. 121, p. 337-340, 2004.

GERMANO, P.M.L. Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de imunofluorescência indireta, na cidade de Campinas em 1981, **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.**, São Paulo, v.22, p.53-58, 1985.

GEORGE, L.L.; CASTRO, R.R.L. Tecido nervoso. In:_____ **Histologia Comparada**, 2ª ed. São Paulo: Roca, 1998, 286p.

GIRALDI, J. H.; BRACARENSE, A. P. F. R.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E. A.; NAVARRO, I. T.; BATISTA, T. N. Serology and histopathology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs with neurologic disorders. **Sem. Cienc. Agr.**, Londrina, v.23, n.1, p. 9-14, 2002.

GIROLAMI, U.; FROSCH, M. P.; ANTHONY, D. C. The Central Nervous System. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins pathologic basis of disease**, 5. ed. Philadelphia: Saunders, 1994. p.1325-1326.

GUIMARÃES, A.M.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; CURY, M.C.; SPIEWAK, G. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 44, n. 1, p. 67-68, 1992.

HASS, J. A.; SHELL, L.; SAUNDERS, G. Neurological manifestations of toxoplasmosis: a literature review and case summary. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Lakewood, v. 25, p. 253-260, 1989.

HELLEY, D. M. Toxoplasmosis. **J. Small Anim. Pract.**, v.4, p. 627-629, 1970.

HIRANO, A. Neurons, astrocytes and ependyma. In: DAVIS, R.C.; ROBERTSON, D.M. **Textbook of neuropathology**. Baltimore: Williams & Williams, 1985. 115p.

HIRT, H. **Toxoplasmosis**. 2. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1976, 234p.

HUTCHISON, W. M. The fecal transmission of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, Copenhagen, v.74, n.3, p.462-464, 1968.

HUTCHISON, W. M. Coccidian like nature of *Toxoplasma gondii* , **Br. Med. J.**, London, v.1, p.142-144, 1970.

HUTCHISON, W. M. The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. **Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n.3, p. 380-399, 1971.

ISHIZUKA, M. M.; MIGUEL, O; BROGLIATO, D. F. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soro de cães no município de São Paulo, **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.**, São Paulo, v.11, p.115-125, 1974.

ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O, BROGLIATO, D.F. Incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães do município de São Paulo. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.** , São Paulo, v. 18, p. 161-165, 1981.

JACOBS, L.; MELTON, M. L. A procedure for testing meat samples for *Toxoplasma* with preliminar results of a survey of pork and beef sample. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.42, n.2, p.38-39, 1973.

JAMES, G. S. Comparison of cell culture, mouse inoculation and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.6, p. 1572-1575, 1996.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M. *Toxoplasma gondii* in the United States, 1999-2000. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, p. 1371-1374, 2003.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. California: Academic Press, 1993, v. 1, 437p.

JUNQUEIRA, J.; CARNEIRO, F. Tecido nervoso. In:_____ **Histologia básica** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 154-183.

KANETO, C. N. **Infecção experimental de frangos de corte com oocistos, cistos e taquizoítos de *Toxoplasma gondii***. 1995. 71f. Dissertação (Mestrado em Patologia

Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 1995.

KEAN, G.H. Clinical toxoplasmosis – 50 years. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.66, n.4, p.549-567, 1972.

KIMELBERG, H. K. **Glial Cell Receptors**. New York: Raven Press, 1988, 237p.

KOPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.41, n. 4, p. 229-235, 2005.

LAPPIN, M. R. Infecções protozoárias e mistas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**, 5ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.433-435.

LANGONI, H.; MODOLO, J. R.; PEZERICO, S. B. Serological profile of anti-*Toxoplasma gondii* in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, São Paulo State, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v.12,, n. 1,, p. 142-148, 2006.

LANTOS, P.L. Cytology of the normal central nervous system. In: WEDER, R.O. **Nervous system, muscles and eyes**. Systemic Pathology. Edinburg: Churchill Livingstone, 1990. p30-35.

LEMOES, K.R. **Imunorreatividade de astrócitos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em sistema nervoso central de eqüinos normais ou com leucoencefalomalácia**. 1995. 103 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

LINDSAY, S. D. Serological prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Kansas. **J. Helminthol. Soc.**, Washington, v.57, n.1, p.86-88, 1990.

LINDSAY, S. D.; DUBEY, J. P.; BUTLER, J. M.; BLAGBURN, B. L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 27-33, 1997.

LOPEZ, A.; DIETZ, V. J.; WILSON, M.; NAVIN, T.; JONES, J. L. Preventing congenital toxoplasmosis. **Morb. Mort. Wkly. Rep.**, v.49, p. 59-75, 2000.

LYONS, A.S.; PETRUCELLI, R.J. **Medicine**. New York: Abradale Press. 1987. 615p.

MACHADO, C.R.S. Tecido nervoso. In: MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002, 363p.

MARKUS, M. B. Earthworms and coccidian oocysts. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.68, n.2, p. 247-248, 1974.

MEIRELES, L. R.; GALISTEO Jr., A. J.; POMPEU, E.; ANDRADE Jr., H. F. *Toxoplasmosa gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Trop. Med. Int. Health**, v. 9, p. 876-881, 2004.

MIGLIANO, L. Um caso de toxoplasmose canina. **Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v.26, n. 1, p.273-274, 1912.

MINEO, T. W. P. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas gerais. **Arq. Bras.Med. Vet. Zoot.**, v.56, n.3, p. 414-417, 2004.

MITRO, A.; BUXTON, F.; HUDSON, J. A. Histological study of the spinal central canal of the neonatal Beagle dog. **Folia Vet.** , v.40, n.3 / 4, p.91-95, 1996.

MOLENAAR, G.J. O Sistema Nervoso. In: DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 663p.

MONICI, L. Alterações histológicas observadas em casos de toxoplasmose canina. **Bol. Soc. Paul. Med. Vet.**, São Paulo, v.8, n.1, p.14-19, 1947.

MONTGOMERY, D. L. Astrocytes: form, functions and roles in disease. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 31, p. 145-167, 1994.

MORETTI, L. D.; UENO, T. E.; RIBEIRO, M. G. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. **Sem. Cienc. Agr.**, Londrina, v.23, n.1, p. 85-91, 2002.

MORIARTY, L.J.; BORGES, R.B. An oscillating extracellular voltage gradient reduces the density and influences the orientation of astrocytes in injured mammalian spinal cord. **J. Neurocytol.**; v.30, n.1, p 45-57, 2001.

NESBIT, J.W.; LOURENS, D.C.; WILLIAMS, M.C. Spastic paresis in two littermate pups caused by *Toxoplasma gondii*. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, Pretoria, v. 52, p. 243-246, 1981.

NEVES, J.G.; FERRI, A.G.; SALIBA, A.M. Toxoplasmose canina. **Veterinária**, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.35-44, 1954.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une protozoaire nouveau du gondi, *Toxoplasma*. **Arch. Inst. Pasteur**, Tunis, v.2, p.216-218, 1908.

OLIVEIRA, F.C.R. **Infecção experimental de *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bubalus bubalis* com oocistos de *Toxoplasma gondii*. Estudo comparativo**. 1997. 92f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Encefalite por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães. **Clín. Vet.**, v.9, n.48, p. 44-52, 2004.

PARAENSE, W.L.; VIANA, Y.L. Algumas observações sobre a babesiose em cães no Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.46, n. 3, p.595-603, 1948.

PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H. **The fine structure of the central nervous system:** Neurons and their supporting cells. 3. ed. Oxford: Oxford University, 1991, 494p.

PIMENTA, A L.; PIZA, E.T.; CARDOSO, R.B.; DUBEY, J.P. Visceral toxoplasmosis in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 45, p. 323-326, 1993.

PIPER, R.C.; COLE, C.R.; SHADDUCK, J.A Natural and Experimental ocular toxoplasmosis in animals. **Am. J. Ophthalmol.**, Chicago, v. 69, p. 662-668, 1970.

ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J.; KAYE, G.I. Nervous tissue – In: _____ **Histology:** a text and atlas 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, 823p.

RUIZ, A. Isolation of *Toxoplasma gondii* from soil. **J. Parasitol.**, v.59, n.1, p.204-206, 1973.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. *Toxoplasma gondii* in Costa Rican cats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.29, n.2, p. 1150-1160, 1980.

SALATA, E.; YOSHIDA, E. L. A.; PEREIRA, E. A.; CORREA, F. M. A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.27, n.1, p.20-22, 1985.

SALIBA, A.M.; FUEHS, H.; FREITAS, D.C. Toxoplasmose canina. **Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 35-41, 1958.

SANTOS, J.A.; NOVLOSKI, G.; PEREIRA, E.F.C.; REZENDE, A.M.L. Estudos sobre a incidência e as lesões histopatológicas da toxoplasmose em mamíferos domésticos (cães e coelhos) no Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 3, n. 2, p. 275-28, 1968.

SAVRO, V.A The comparative morphological aspect of the formation of the macroglial environment of the spinal cord motor neurons. **Morfologia**, v.110, n.6, p.55-59, 1996.

SIKES, R.K. Toxoplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 180, n. 8, p. 857-859, 1982.

SMITH, J. L. Documented outbreaks of toxoplasmosis: transmission of *Toxoplasma gondii* to humans. **J. Food Protect.**, v.56, n.4, p. 630-639, 1993.

SOGORB, F.; JAMBA, L.F.; GUIMARÃES, E.C.; DEANE, M.P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres em São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 14, n.5, p. 314-320, 1972.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita dei Gonigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in multipunti il Kala-Azar dell Uomo. **Rev. Soc. Sci.**, v.3, n.1, p.109-112, 1908.

SUTER, M.M.; HAUSER, B.; PALMER, D.G.; OETTLI, P. Polymyositis – polyradiculitis due to toxoplasmosis in the dog: Serology and tissue biopsy as diagnostic aids. **Zentralbl. Veterinaermed.**, Hamburg, v. 31, n.10, p. 792-798, 1984.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. D. Inflammatory diseases of the central nervous system. In: _____. **Veterinary neuropathology**, St. Louis: Mosby, 1995. p.162-165.

SVOBODA, M.; SVOBODOVA, V. Effects of breed, sex, age, management and nutrition on the incidence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs and cats. **Acta Vet.**, Brno, v.56, n.3, p. 315-330, 1987.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Infecções bacterianas, riquetsiais, protozoais e outras. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 296-298.

TENTER, A. M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*, Tokai, **J. Exp. Clin. Med.**, v.23, p. 391, 1999.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Intern. J. Parasitol.**, Elmsford, n.30, p.1217-1258, 2000.

THOMAS, W. B. Inflammatory diseases of the central nervous system in dogs. **Clin. Tech. Small An. Pract.**, v.13, n.3, p. 167-178, 1998.

TODD, E. C. D. Preliminary estimates of costs in foodborne disease in the United States, **J. Food Protect.**, v. 52, n.1, p. 595-601, 1989.

TOLOSA, E.M.C. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003.

TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, p. 1375-1380, 2003.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Sem. Ciênc. Agr.**, Londrina, v.13, n.1, p.69-75, 1992.

WAGNER, E.C.; RAYMOND, P. A Muller glial cells of the goldfish retina area phagocytic *in vitro* but not *in vivo*. **Exp. Eye Res.**, New York, v. 53, p. 583-589, 1991.

WALLACE, G. D. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by filth flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.20, n. 3, p. 411-413, 1971.

WATABE, K.; OSBORNE, D.; KIM, S. Phagocytic activity of human adult astrocytes and oligodendrocytes in culture. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, Lawrence, v. 48, n. 5, p. 499-506, 1989.

YLMAZ, M. S.; HOPKINS, S. H. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **J. Parasitol.**, v.58, n.5, p. 938-939, 1972.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. Sistema Nervoso Central. In: YOUNG, B. **Wheater histologia funcional**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 415p.

ZAJDENWEBER, M.; MUCCIOLI, C.; BELFORT Jr., R. Acometimento ocular em pacientes com AIDS e toxoplasmose do sistema nervoso central – antes e depois do HAART, **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.68, n.6, p.773-775, 2005.

ZHANG, C.; GOTO, N.; ZHOLE, M. Morphometry analyses and aging process of nerve fibers in the human spinal posterior funiculus. **Okajimas Folia Anat. Jpn**, v.72, n. 5, p.259-264, 1995.

ANEXOS

TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

Anexo I. Coloração de Hematoxilina-eosina (cora células em geral) (TOLOSA, 2003)

1. Corantes e Soluções:

- Hematoxilina de Harris
- Eosina
- Álcool 95% acidificado com ácido clorídrico 1%

2. Fixador: indiferente

3. Método de coloração:

- desparafinar;
- lavar em água corrente por 5 minutos;
- corar pela Hematoxilina de Harris por 5 a 15 minutos;
- lavar em água corrente por 5 minutos e limpar as lâminas;
- diferenciar em álcool-ácido até que os núcleos fiquem bem diferenciados;
- lavar em água corrente por 10 minutos;
- corar pela Eosina por 3 a 5 minutos;
- lavar em água destilada;
- desidratar;
- montar.

Anexo II. Coloração de Tricromo de Masson (cora fibras colágenas) (TOLOSA, 2003)

1. Corantes e Soluções

- Hematoxilina férrica – Weigert
- Fucsina ácida – escarlata de Biebrich
- Solução fosfotúngstica 5% - ácido fosfomolibdico 5%
- Azul de anilina-acética
- Ácido acético sol. aq. 1%

2. Fixador: Bouin

3. Método de coloração

- desparafinar;
- lavar em água corrente por 1 hora até desaparecer a cor do fixador;
- lavar em água destilada por 5 minutos;
- corar em Hematoxilina férrica de Weigert (velha) ou de Harris, durante 5 minutos;
- lavar em água corrente por 5 minutos;
- lavar em água destilada por 5 minutos;
- corar pela Fucsina ácida-escarlata de Biebrich por 5 minutos;
- lavar em água destilada por 10 minutos;
- tratar pelo ácido fosfotúngstico-ácido fosfomolibdico por 10 minutos;
- sem lavar, corar pelo azul de anilina-acética por 10 minutos;
- lavar em água destilada por 5 minutos;
- lavar em solução de ácido acético 1% por 3 minutos
- lavar em água destilada por 5 minutos;
- desidratar;
- montar.

Anexo IIIA. Coloração pela Impregnação pela Prata (cora micróglia) (TOLOSA, 2003)

1. Corantes e Soluções:

- água amoniacal
- solução de Piridina-amoniaca
- Formalina 1%
- Solução de Prata – carbonato de sódio
- Solução aquosa de Hipossulfito de sódio 5%
- Cloreto de ouro 0,2% - sol. aq.

2. Fixador: Formalina-brometo de amônio

3. Método de coloração:

- passar uma noite em solução amoniacal;
- tratar durante 1 a 24 horas em solução Piridina amoniacal;
- lavar rapidamente em dois banhos de água destilada;
- tratar pela solução de Prata-carbonato de sódio em 2 a 3 banhos de 2 a 5 minutos cada;
- lavar rapidamente em água destilada;
- tratar pela Formalina por 2 minutos;
- lavar rapidamente em água destilada;
- descorar pelo cloreto de ouro a frio e, depois, aquecido de 40 a 50 °C até que o corte adquira cor violácea;
- tratar pelo hipossulfito de sódio por 1 minuto;
- lavar em água destilada por 3 minutos;
- desidratar;
- montar.

Anexo IIIB. Coloração pela Impregnação pela Prata (cora oligodendróglia) (TOLOSA, 2003)

1. Corantes e Soluções:

- formol – brometo de amônio
- ácido brômico 5% - sol. aq.
- Prata – carbonato de lítio-Hortega – sol. aq.
- Cloreto de ouro 5% - sol. aq.
- Hipossulfito de sódio – sol. aq.
- Formalina 1%

2. Fixador: formalina – brometo de amônio

3. Método de coloração:

- lavar em água destilada por 10 minutos;
- tratar pela solução de nitrato de prata- carbonato de lítio de 1 a 5 minutos;
- lavar e agitar, lentamente, durante 15 segundos em água destilada;
- reduzir pela formalina 1% - 1 minuto;
- tratar pelo cloreto de ouro até a cor cinza (10 a 15 minutos);
- tratar pelo hipossulfito de sódio por 1 minuto;
- lavar em água destilada;
- desidratar;
- montar.

Anexo IV. Coloração por Peroxidase Anti-peroxidase (cora astrócitos) (LEMOS, 1995)

1. Método de coloração:

- cortes desparafinados e hidratados
- - tratar com solução de metanol e água destilada em partes iguais mais 1% de peróxido de hidrogênio (30 vol), durante 45 minutos (inibição da peroxidase endógena tecidual);
- incubação em solução de tripsina a 0,1% em tampão pH 7,8 a 37°, por 25 minutos;
- lavar durante 5 minutos em água destilada e depois com PBS, pH 7,3, por 5 minutos;
- incubação com o anticorpo primário anti-GFAP (DAKO), policlonal, produzido em coelho, diluído a 1:300 em PBS pH 7,3, durante 14-17 horas a 4°;
- lavar suas vezes, por 5 minutos, com PBS, pH 7,3;
- incubação com anticorpo de ligação anti igG de coelho, produzido em ovinos, por 45 minutos, em diluição de 1:25 em PBS, pH 7,3;
- lavar suas vezes, por 5 minutos, com PBS, pH 7,3;
- incubação em PAP, diluição 1:200 em PBS, pH 7,3, durante 45 minutos;
- incubação com diaminobenzidina (DAB) a 0,03% em solução junto contendo peróxido de hidrogênio a 0,03%, durante 5 a 8 minutos, em ambiente com pouca luminosidade;
- coloração de contraste com Hematoxilina de Harris 1:2 com água destilada, durante 30 segundos;
- desidratar e montar.

2. Preparo do material para imunoistoquímica

2.1. Diluição do Anticorpo Primário:

O anticorpo primário anti-GFAP, policlonal DAKO (Z334), produzido em coelho, foi alíquotizado em 10µl e conservado à temperatura de – 17° C. Para utilização, era diluído a 1:300, em PBS, pH 7,2. Padronização da diluição foi feita anteriormente em experimentos pilotos.

2.2. Diluição do Anticorpo secundário

O anticorpo ovino anti-coelho (SIGMA R-6503) foi dividido em alíquotas de 80µl e armazenado à – 17°C. Para utilização foi reconstituído com PBS, na concentração 1:25, em pH de 7,2.

2.3. Diluição do Complexo Enzimático Peroxidase Anti-peroxidase

O complexo peroxidase antiperoxidase (PAP) (SIGMA P-2026) foi dividido em alíquotas de 10µl e armazenado a – 17°. Para utilização foi diluído a 1:200.

2.4. Preparo da solução de Diaminobenzidina (DAB)

A diaminobenzidina (SIGMA D-9015) foi preparada com 100 mg de DAB em 16,6ml de PBS, com uma concentração a 6 mg/ml, alíquotas de 100µl foram conservadas a –17°C. Para utilização reconstituía-se em 200µl de uma solução de H₂O₂ a 1% em PBS.

- solução de H₂O₂ a 1% (solução A)
peróxido de hidrogênio (30 vol).....50μl
PBS qsp.....6000μl
- diaminobenzidina (DAB)
solução A200μl
DAB100μl
PBS1700μl