

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS - FCAV
CÂMPUS DE JABOTICABAL

“VIABILIDADE DA TRANSMISSÃO SEXUAL DE *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) PELA BIOTÉCNICA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM FÊMEAS BOVINAS (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) SORONEGATIVAS”

Gustavo Felippelli
Médico Veterinário

JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL
Fevereiro de 2017
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS - FCAV
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“VIABILIDADE DA TRANSMISSÃO SEXUAL DE
Toxoplasma gondii (Nicolle & Manceaux, 1909) PELA
BIOTÉCNICA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM FÊMEAS
BOVINAS (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*)
SORONEGATIVAS”**

Gustavo Felippelli

Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Tese apresentada à Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

**JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL
Fevereiro de 2017**

F315a Felippelli, Gustavo
Viabilidade da transmissão sexual de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) pela biotécnica da inseminação artificial em fêmeas bovinas (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) soronegativas / Gustavo Felippelli. – – Jaboticabal, 2017
xii, 100 p. il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Alvimar José da Costa
Banca examinadora: Lindisay Unno Gimenez, Katia Denise Saraiva Bresciane, Welber Daniel Zanetti Lopes, Carlos Noriyuki Kaneto

Bibliografia

1 Criopresevação. 2. Amostra RH. 3. Toxoplasmose.
4. *nested* PCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.975.636.2

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: VIABILIDADE DA TRANSMISSÃO SEXUAL DE *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) PELA BIOTÉCNICA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM FÊMEAS BOVINAS (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) SORONEGATIVAS

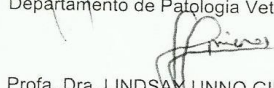
AUTOR: GUSTAVO FELIPPELLI

ORIENTADOR: ALVIMAR JOSÉ DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ALVIMAR JOSÉ DA COSTA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA / Unesp - Araçatuba,sp



Prof. Dr. WELBER DANIEL ZANETTI LOPES
Faculdade de Medicina Veterinária / UFG - Goiânia, GO



Prof. Dr. CARLOS NORIYUKI KANETO
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA / Unesp - Araçatuba,sp

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017

“A vida é medida pelo que se alcança, não apenas pelos anos”

Bruce McLaren

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gustavo Felippelli – Filho de José Antônio Fernandes Felippelli e Roselene da Silva Felippelli nasceu em 18 de julho de 1986, na cidade de Jaboticabal/SP. Em 2004 ingressou na Faculdade Dr. Francisco Maeda (FAFRAM), Ituverava/SP, onde em 2009 formou-se em Medicina Veterinária. Neste mesmo ano fez estágio curricular no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HV), Unidade Auxiliar da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Unesp - Câmpus de Jaboticabal, junto ao Departamentos de Clínica e Cirurgia Veterinária, setor de Grandes Animais. Em outubro de 2009 ingressou como pesquisador no CPPAR – Centro de Pesquisa em Sanidade Animal até 2016. Em 2010 foi selecionado para o Mestrado, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal, da FCAV/UNESP, obteve o título em 2012. No ano de 2013 ingressou no curso de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal, nesta mesma faculdade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José Antônio** e **Rose**, pelo amor e por nunca deixarem de incentivar nossos objetivos e sonhos, meus exemplos de vida.

Ao meu irmão **Danilo** por sempre me motivar e ser mais que um irmão na minha vida.

A renovação da Família meu sobrinho **Danilinho**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre guiar meus passos, pela minha família, pela saúde para sempre levantar e seguir em frente

Ao **Prof. Dr. Alvimar José da Costa** pela oportunidade, pelo voto de confiança, por estes sete anos de crescimento como profissional, incentivo em extrair sempre o melhor de cada um. Ao senhor minha eterna gratidão, admiração, e orgulho por ter sido seu orientado.

Ao **Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira** pela amizade e enorme conhecimento, foi um privilégio conviver esses anos ao lado de um exemplo de pessoa e pesquisador.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de estudo processo nº 2013/16040-1, fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao **CPPAR – Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – FCAV/UNESP**, por ter me proporcionado tantas amizades que tenho certeza que vou levar para o resto de minha vida, pela oportunidade de me encontrar como profissional proporcionando conhecimentos essenciais à minha formação técnica e sustentação no decorrer dos cursos de pós-graduação (Mestrado e Doutorado).

Aos professores **Dra Katia Denise Saraiva Bresciani, Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes, Dr. Carlos Noriuki Kaneto, Dra. Lindsay Unno Gimenes**, por terem aceitado o convite como membros da minha “Banca de defesa de tese”.

Aos professores **Dra Katia Denise Saraiva Bresciani, Dr. Marcos Rogério André, Dra. Lindsay Unno Gimenes, Dr. Gilson Pereira Oliveira**, pelas contribuições ímpares que permitiram a aprovação no Exame Geral de Qualificação

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini** pelas correções e avaliações positivas do projeto de pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Hélio Langoni** e a Mestranda **Samea Joaquim Fernandes** da FMVZ/UNESP – Botucatu/SP, pela parceria na execução da *nested* PCR.

Ao **Prof. Vando Edésio** pela realização das análises estatísticas

Ao **Dr. Athos Assumpção Pastore** pela a enorme e importante ajuda primordial para desenvolvimento desse projeto

Ao **Dr. Rafael Rodrigues Corrêa** (Ourofino Saúde Animal Ltda.) pela amizade e enorme ajuda com a inseminação artificial dos animais e do diagnóstico ultrassonográfico.

Ao. **Msc. Marcel Onizuca Vilalba** (Ourofino Saúde Animal Ltda.) pela amizade e doação do protocolo hormonal para realização da IATF.

Ao **Ingo Aron Souza Mello** (Ourofino Saúde Animal Ltda.) pela ajuda na seleção dos touros reprodutores e fêmeas bovinas

Ao **Leonardo Homem** pela amizade e na seleção e manejo diário dos animais.

Ao **Nathan da Rocha Neves Cruz** pela amizade e realização dos exames hematológicos.

Ao bolsista de iniciação científica da Fapesp **João Henrique Barbosa Toscano** a **Larissa Marquizeppe** iniciação científica sem bolsa, pela grande amizade, comprometimento com o projeto de pesquisa.

Aos estagiários **Dalmo Quilis, Jefferson Cavazanna, Maria Eduarda Tozato, Giovana Vital Pavão, Bruna Salatta, Matheus Dário (UEM) e Matheus Pascotto (UEM)**, pela a enorme contribuição para que o projeto fosse concluído

Aos amigos do CPPAR e IPESA: pesquisadores **Isabella Barbosa dos Santos, Breno Cayeiro Cruz, William Gequelim Maciel, Carlos Augusto Silva Nicolino, Carolina Buzzulini, Lucas Vinicius Costa Gomes, Daniel Pacheco Melo, Thalita Silveira Righi e Weslen Fabricio Pires Texeira** e todos os outros pesquisadores que precederam com qual tive o imenso prazer e privilégio de trabalhar junto, funcionários: **Ana Lúcia Doni, Lilian Celiane, Dilecélio, Clóvis e Aurélio *in memorium***.

A todos os professores e funcionários responsáveis pelo Programa de Pós-graduação de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp, campus Jaboticabal.

Aos irmãos e amigos da República Skolaxo (Ituverava): **Milton César, Marcelo, Carlos Eduardo, Leopoldo, Guilherme, César, Tarcísio e Matheus *in memorium***; República Boate Azul: **Gabriel Pimentel, Rodrigo, João Marcos, Felipe, Ivan, Rafael, Bruno, Gabriel, Vinicius, Júlio, João Augusto, Hugo, Rodolfo, Rafael Lima, Iago e Jefferson**; República Santo Mé: **Cyro, João Vitor e Ricardo**; República Chapa Fria: **Matheus, Samuel, Murilo, André, Felipe e Álvaro**, por todos os momentos vividos em todos esses anos de convívio.

A todos os amigos que ajudaram diretamente e indiretamente, esta vitória é toda nossa a cada atitude e palavra de incentivo a nunca desistir.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Toxoplasmose	3
2.2 Toxoplasmose em Bovinos	5
2.3 Importância dos Crioprotetores na manutenção de espécimes	6
2.4 Importâncias dos Crioprotetores na manutenção de Sêmen.....	8
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 Geral	10
3.2 Específicos	10
3.2.1 Machos:.....	10
3.2.2 Fêmeas:.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Cronograma das atividades realizadas	11
4.2 Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).....	14
4.3 Amostra de <i>T. gondii</i>	14
4.4 Obtenção dos taquizoítos de <i>T. gondii</i>	14
4.5 Confecção das lâminas com antígenos para RIFI	15
4.6 Seleção do Bovino macho reprodutor experimental.....	15
4.6 Colheita de sêmen do bovino reprodutor	16
4.7 Detecção do DNA de <i>T. gondii</i> pela PCR.....	17
4.8 Inoculação de taquizoítos de <i>T.gondii</i> no sêmen.....	18
4.9 Análise da Viabilidade e Infectividade do <i>T. gondii</i> nas Amostras Seminais Criopreservadas	18
4.10 Seleção das vacas reprodutoras experimentais para realização da Inseminação artificial em tempo fixo – (IATF)	20
4.11 Brucelose	21
4.12 Leptospirose	21
4.13 Diarréia Viral Bovina (BVD) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR).....	21
4.14 Neosporose e Toxoplasmose.....	22
4.15 Sincronização de Cio e Inseminação artificial em tempo fixo.....	22
4.16 Inseminação Artificial em Tempo Fixo com sêmen contaminado por <i>Toxoplasma gondii</i>	23
4.17 Exames clínicos e laboratoriais das Fêmeas.....	24
4.17.1 Parâmetros clínicos	24
4.17.2 Resposta imune humoral das fêmeas	24
4.17.3 Determinação da parasitemia nas vacas.....	25
4.17.4 Necropsias das fêmeas bovinas	25
4.17.5 Bioensaio em camundongos.....	26
4.17.6 Detecção de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> nested PCR e eletroforese ..	27
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6. RESULTADOS.....	29
7. DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÕES	59
9. REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	81

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Registros de preservação do <i>Toxoplasma gondii</i> em várias temperaturas com ou sem crioprotetor.	8
Tabela 2. Delineamento experimental das principais concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) que foram testados para aferir a viabilidade e infectividade do <i>Toxoplasma gondii</i> e do sêmen, CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.	19
Tabela 3. Parâmetros espermáticos do sêmen bovino criopreservado em diluentes contendo diferentes concentrações de DMSO adicionado com 1×10^6 taquizóitos de <i>Toxoplasma gondii</i> após (24 horas) descongelamento. CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.	29
Tabela 4. Mortalidade dos camundongos submetidos à bioprova, média do tempo de sobrevivência e taquizóitos recuperados dos exsudatos peritoneais. CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.	30
Tabela 5. Resultados sorológicos obtidos em camundongos submetidos à bioprova. CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.	31
Tabela 6. Resultados das comparações múltiplas dos valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e infectado com <i>Toxoplasma gondii</i> (Amostra RH). CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal/SP, Brasil. (Continua...).....	40
Tabela 7. Recíprocas sorológicas obtidas por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros, colhidas das fêmeas bovinas não infectados e infectados via sêmen com <i>Toxoplasma gondii</i> (Amostra RH), nas diferentes datas experimentais. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.	46

Tabela 8. Presença de <i>Toxoplasma gondii</i> , realizada por meio da Bioprova e <i>nested</i> PCR, em amostras teciduais colhidas das fêmeas bovinas (GC e GCT). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.	48
Tabela 9. Valores de referência para a espécie bovina (adultos).	82
Tabela 10. Resultados das comparações múltiplas dos parâmetros clínicos aferidos em fêmeas bovinas pertencentes aos dois grupos experimentais. CPPAR/FAV/UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.....	83
Tabela 11. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com <i>Toxoplasma gondii</i> * (amostra RH), pré-inseminação artificial (D-1); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....	84
Tabela 12. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com <i>Toxoplasma gondii</i> * (amostra RH), pós-inseminação artificial (D1); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....	85
Tabela 13. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com <i>Toxoplasma gondii</i> * (amostra RH), pós-inseminação artificial (D3); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....	86
Tabela 14. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com <i>Toxoplasma gondii</i> * (amostra RH), pós-inseminação artificial (D5); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....	87
Tabela 15. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com <i>Toxoplasma gondii</i> * (amostra RH), pós-inseminação artificial (D7); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....	88

- Tabela 16.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D12); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....89
- Tabela 17.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D14); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....90
- Tabela 18.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D21); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....91
- Tabela 19.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D28); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....92
- Tabela 20.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D35); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....93
- Tabela 21.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D42); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....94
- Tabela 22.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D49); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....95

- Tabela 23.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D56); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....96
- Tabela 24.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D63); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....97
- Tabela 25.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D70); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....98
- Tabela 26.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D77); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....99
- Tabela 27.** Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D100); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.....100

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*: vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos (MOURA, AMENDOEIRA & BARBOSA, 2009).....4
- Figura 2.** (A) eletroejaculador; (B) “probe” para bovinos; (C) “kit” para colheita de sêmen; (D) Limpeza retal e massagem prostática, preparando o touro para a colheita de sêmen.16
- Figura 3.** Fêmeas bovinas selecionadas no setor de bovinos do CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.20
- Figura 4.** Protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....23
- Figura 5.** Fêmea bovina Nº1807, sendo inseminada no último dia do protocolo de IATF. CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.....24
- Figura 6.** Temperaturas médias retais mensuradas em fêmeas bovinas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), via inseminação artificial em tempo fixo (IATF). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.....33
- Figura 7.** Frequências cardíacas médias (bmp) mensuradas em fêmeas bovinas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), via inseminação artificial em tempo fixo (IATF). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.....34
- Figura 8.** Frequências respiratórias médias (mpm) mensuradas em fêmeas bovinas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), via inseminação artificial em tempo fixo (IATF). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.....35

Figura 9. Movimentos ruminais mensurados em fêmeas bovinas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), via inseminação artificial em tempo fixo (IATF). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.....36

Figura 10. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x, adicionado de 1µL/10mL de Sybr Safe (Life Technologies). A corrida foi realizada inicialmente a 80V por 60 minutos. Após a corrida o produto da amplificação foi visualizado em sistema de foto documentação digital, Sistema Gel-Doc it18, sob luz ultra-violeta e fotografado (Continua..).49

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C: Graus Celcius

%: Porcentagem

≥: Maior igual que

≤: Menos igual que

AVMA: Guidelines on Euthanasia of Animals

bp : Pares de bases

bpm: Batimentos por minuto

BVD: Diarreia viral bovina

cPCR: Reação em cadeia de polimerase convencional

CPPAR: Centro de Pesquisa em Sanidade Animal

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPI: Dias pós-inoculação

DPIA: Dias pós-inseminação articial

ECP: Cipionato de estradiol

FC: Frequência cardíaca

FR: Frequência respiratória

IATF: Inseminação artificial em tempo fixo

IBR: Rinotraqueite infecciosa bovina

IgM: Imunoglobulina classe M

IgG: Imunoglobulina classe G

ME49: Amostra de *Toxoplasma gondii*

mpm: Movimento por minuto

OMS: Organização mundial de saúde

P: Amostra de *Toxoplasma gondii*

PGF α 2: Prostaglandina

RH: Amostra de *Toxoplasma gondii*

RIFI: Reação de imunofluorescência indireta

T°C: Temperatura corpórea

SAM : Soroalgotinação microscópica

VEG: Amostra de *Toxoplasma gondii*



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

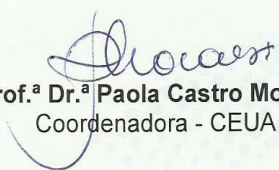


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 026341/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Viabilidade da transmissão sexual de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) pela biotécnica da inseminação artificial em fêmeas bovinas (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) soronegativas**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 04 de dezembro de 2013.

Jaboticabal, 12 de dezembro de 2013.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

VIABILIDADE DA TRANSMISSÃO SEXUAL DE *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) PELA BIOTÉCNICA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM FÊMEAS BOVINAS (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) SORONEGATIVAS

RESUMO – A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita, importante em medicina veterinária e humana por ocasionar abortos e doenças congênitas em diversas espécies. A viabilidade da transmissão sexual do *Toxoplasma gondii* em vacas, sorologicamente negativas para a infecção por *T. gondii*, submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen criopreservado e contaminado com taquizoítos de *T. gondii*, por meio das técnicas (RIFI, bioprova e *nested* PCR). Inicialmente, utilizou-se a bioprova (em inoculação camundongos) objetivando avaliar a sobrevivência de taquizoítos de *T. gondii* em sêmen, criopreservado em DMSO (2,5%, 5,0%, 7,5%, 8,0% e 10,0%) e congelado em nitrogênio líquido (-196°C). Foram selecionadas 10 vacas em idade reprodutiva, soronegativas: *Brucella abortus*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*. Os animais foram submetidos ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e tratados com dose única de estreptomicina (25mg/Kg) contra leptospirose. Das 10 vacas, cinco foram inseminadas com sêmen convencional (Glicerol 3%) e mantidas como grupo controle. As outras cinco foram inseminadas com sêmen criopreservado com DMSO (8%), contendo 1×10^6 taquizoítos de *T. gondii*. Nas datas experimentais 1, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 28, 35, 42, 50, 56, 63, 70, 77 e 100 dias pós-inoculação (IATF), exames clínicos, hematológicos e sorológicos e moleculares (*nested* PCR) foram realizados. A soroconversão ocorreu em quatro fêmeas bovinas, pertencentes ao grupo que receberam sêmen infectado com taquizoítos de *T. gondii* (Amostra RH). Decorridos 21 dias pós-inseminação artificial foi possível diagnosticar em uma vaca (nº 1008), deste mesmo grupo, recíproca crescente de títulos sorológicos variando de 64 até 256 (28º, 35º, 42º DPIA). A partir do 49º até o 100º DPIA, os títulos foram decrescendo de 128 a 64, caracterizando um processo de cronificação (títulos IgG anti-*T. gondii* ≥ 64). Outras três fêmeas bovinas (nº 1108, nº 2018 e nº 3462) apresentaram títulos sorológicos (64) a partir do 56º até 100º DPIA. Apenas uma fêmea do grupo infectado não apresentou soroconversão durante todo estudo. Nenhum animal pertencente ao grupo controle apresentou anticorpos (IgG) contra *T. gondii* ao longo de todo experimento. No 100º DPIA, sete vacas que não estavam gestantes pelo exame ultrassonográfico, de ambos os grupos foram eutanasiadas e necropsiadas. Foram colhidos tecidos (cérebro, retina, pulmão, fígado, baço, linfonodos mesentéricos, musculatura – *Longissimus dorsi*, ovário e útero). Foi possível diagnosticar a presença do parasito por meio do bioensaio e *nested* PCR. O parasitismo tissular por *T. gondii* (bioensaio e *nested* PCR) foi diagnosticado em retina, musculatura, cérebro e fígado pertencentes às vacas nº 1008, nº 2018, nº 0813, nº 1108 e nº 3462. Em síntese, estes resultados sugerem a viabilidade da transmissão, via IATF *Toxoplasma gondii* em bovinos.

Palavra-chave: Criopresevação, Amostra RH, Toxoplasmose, *nested* PCR.

VIABILITY OF SEXUAL TRANSMISSION OF *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) THROUGH THE ARTIFICIAL INSEMINATION BIOTECHNOLOGY IN SERONEGATIVE BOVINE (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) FEMALES

ABSTRACT – Toxoplasmosis is a cosmopolitan zoonosis, highly relevant in human and veterinary medicine for causing abortion and congenital diseases in several animal species. This study evaluated, using different techniques (indirect immunofluorescence assay, bioassay and *nested* PCR), the viability of sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in cows, serologically negative for the *T. gondii* infection, submitted to fixed time artificial insemination (FTAI) with cryopreserved semen, infected with tachyzoites of *T. gondii*. Initially, bioassays (inoculation in mice) were performed, seeking to analyze the survival of *T. gondii* tachyzoites in semen, cryopreserved in DMSO (2.5%, 5.0%, 7.5%, 8.0% and 10.0%) and frozen in liquid nitrogen (-196 °C). Ten cows at reproductive age were selected, all serologically negative: *Brucella abortus*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*. Animals underwent the protocol for fixed time artificial insemination (FTAI) and were treated with a single dose of streptomycin (25 mg/Kg) against leptospirosis. From these ten cows, five were inseminated with conventional semen (3% Glycerol) and kept as a control group. The five remaining animals were inseminated with semen cryopreserved with DMSO (8%), containing 1×10^6 *T. gondii* tachyzoites. On experimental days 1, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 28, 35, 42, 50, 56, 63, 70, 77 and 100 after inoculation (FTAI), clinical, hematological and serological exams and molecular tests (*nested* PCR) were conducted. Seroconversion occurred in four bovine females which belonged to the group which received semen infected with *T. gondii* tachyzoites (RH strain). 21 days post artificial insemination (DPAI), it was possible to diagnose, in one animal (number 1008) from the same group, mutual increasing of serological titles, varying from 64 to 256 (28th, 35th, and 42nd DPAI). Starting on the 49th, up until 100^o DPAI, titles constantly decreased from 128 to 64, characterizing a cronication process (IgG anti-*T. gondii* titles ≥ 64). Three other bovine females (numbers 1108, 2018 and 3462) presented serological titles (64) starting on the 56th until the 100th DPAI. Only one animal from the infected group did not presented serological conversion throughout the study. No animals from the control group presented antibodies (IgG) against *T. gondii* throughout the entire experiment. On the 100th DPAI, seven cows which were not diagnosed as pregnant on the ultrasonography exam, belonging to both groups, were euthanized and necropsied. Tissue samples (brain, retina, lungs, liver, spleen, mesenteric lymph nodes, muscles – *Longissimus dorsi*, ovary and uterus) were collected during necropsy. It was possible to diagnose presence of the parasite by means of bioassays and *nested* PCR. Tissue parasitism by *T. gondii* (bioassays and *nested* PCR) was diagnosed on retina, muscles, brain and livers obtained from cows 1008, 2018, 0813, 1108 and 3462. In summary, these results suggest the viability of transmission, through TFAI, of *Toxoplasma gondii* in bovines.

Keywords: Cryopreservation, RH Sample, Toxoplasmosis, *nested* PCR.

1. INTRODUÇÃO

Apenas uma espécie de *Toxoplasma* foi descrita, denominada *Toxoplasma gondii*. Membro do filo Apicomplexa, ordem Coccídea, sendo um protozoário intracelular obrigatório que acomete diversos hospedeiros vertebrados incluindo humanos (GARCIA et al., 2006; SHARIF et al., 2007; DUBEY, 2010).

O protozoário *T. gondii* é agente de uma infecção disseminada na população adulta mundial com taxas de prevalência de 20 a 90%. A soroprevalência está diretamente ligada às condições sanitárias e índices socioeconômicos (HILL & DUBEY, 2002; SPALDING et al., 2003).

O *T. gondii* tem como suas principais vias de transmissão a transplacentária (taquizoítos circulantes) exacerbam com mais frequência no terço final de gestação (DUBEY e TOWLE, 1996); transmissão sexual (via sêmen) (MOURA et al., 2005; LOPES et al., 2009; SCARPELLI et al., 2009 e SANTANA et al., 2010); ingestão de água descritos em alguns trabalhos (ARMINI et al., 1998; 1999), de alimentos contaminados com oocistos esporulados oriundos de fezes de gato e, ainda, ingestão de cistos teciduais em carnes cruas e/ou mal cozidas (SILVA et al., 2000).

Diferentes inquéritos revelam que mais de 25% dos ovinos e dos suínos estão infectados, sendo a carne de porco considerada a origem da transmissão mais comum nos Estados Unidos e sul do Brasil (HOLLAND, 2003). Outras formas de infecção humana pelo *T. gondii*, menos frequentes, porém possíveis, podem ocorrer por meio de acidentes laboratoriais (WONG & REMINGTON, 1993; HERWALDT, 2001), transfusão sanguínea e transplante de órgãos (FIGUEROA-DAMIAN, 1998; MUNIR et al., 2000; MONTOYA & LIESENFELD, 2004), ou ingestão de leite cru CHIARI et al. 1984; RIEMANN et al., 1975; SACKS et al., 1982; HILL & DUBEY, 2002).

A toxoplasmose animal ocorre pelo fato dos hospedeiros definitivos e intermediários servirem de forma direta e indireta uma fonte de infecção ao homem, e pelos distúrbios reprodutivos como abortos, mortalidade neonatal e efeitos congênitos derivados da infecção por *Toxoplasma gondii* representarem prejuízos significativos em animais destinados ao consumo humano de valores e animais de companhia (BRESCIANI et al., 1999; SWADOGO et al., 2005; YU et al., 2007).

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

A toxoplasmose congênita é a principal forma da doença em humanos e ocorre em mulheres que tenham um primo-contato com o agente durante a gestação. O parasito infecta a placenta e, posteriormente, o feto (FRENKEL, 1990). Como resultado, tal feto pode apresentar lesões severas (BOWERMAN, 1991). Caso o recém-nascido seja normal, poderá posteriormente apresentar alterações como retardamento mental ou distúrbios psicomotores (DREESEN, 1990).

Em pacientes imunocomprometidos (HIV+, oncológicos, transplantados ou com imunodeficiências genéticas e diabetes), a toxoplasmose manifesta-se com elevada frequência, resultando em uma alta morbidade e mortalidade (HO-YEN, 1992; ISRAELSKI & REMINGTON, 1993; LEWDEN et al., 2005; KHURANA et al., 2005). Sendo considerada uma doença oportunista (LUTF & REMINGTON, 1988) que provoca a reativação dos cistos, principalmente os cerebrais, produzindo grave encefalite (HALONEN et al., 2001; KHETSURIANI et al., 2002; MAMIDI et al., 2002). POTASMAN et al. (1987) observaram uma frequência de encefalite por *T. gondii* entre 6 e 10% de portadores soropositivos (HIV) nos EUA. No Brasil, a infecção pelo *T. gondii* afeta 50% das crianças e 80% das mulheres com maturidade sexual que apresentam anticorpos para o este coccídeo (DUBEY et al., 2012).

A pesquisa com a utilização de animais de produção ou de companhia tem por intuito maior, promover descobertas que visem resguardar a integridade física e sanitária destes. A bovinocultura mostra-se como um dos sistemas de criação que muito se desenvolveu em biotécnicas aplicadas à reprodução nos últimos anos e que, conseqüentemente, passa a necessitar de medidas sanitárias eficientes, não só no aspecto do melhoramento genético dos rebanhos. Desta forma, o estudo da toxoplasmose na espécie bovina relacionada aos métodos e medidas sanitárias das biotécnicas da reprodução torna-se de suma importância.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Toxoplasmose

Parasitas do gênero *Toxoplasma* são protozoários coccídios intracelulares obrigatórios (SHERDING, 1998), descritos pela primeira vez por Nicolle & Manceaux (1908), que isolaram este agente no roedor *Ctenodactylus gundi* no norte da África. Inicialmente, este parasito foi chamado de *Leishmania gondii*, sendo posteriormente denominado *Toxoplasma gondii* (do grego toxon = arco e plasma = corpo) devido à forma de “quarto crescente” ou “meia lua” do parasito e *gondii* referência ao roedor onde o parasito foi isolado (BLACK e BOOTHROYS, 2000; DUBEY, 1998).

A Toxoplasmose é uma doença de caráter zoonótico e cosmopolita, tendo importância na medicina veterinária e humana, por ser um agente promotor de abortamento e de doença congênita em diversas espécies de hospedeiros intermediários. Seu agente é um protozoário denominado *Toxoplasma gondii* de ciclo de vida facultativamente heteróximo e com capacidade de infectar todas as espécies de animais homeotérmicos (TENTER et al., 2000).

Os gatos domésticos em particular e os demais felídeos constituem os principais hospedeiros definitivos desta afecção zoonótica (HUTCHISON, 1965; FARIA et al., 2007), enquanto outros animais de sangue quente mostram-se como hospedeiros intermediários (GARCIA et al., 2006; SILVA et al., 2007).

No seu ciclo evolutivo, o *T. gondii* desenvolve-se em três formas principais: taquizoítos, de rápida multiplicação e que ocorrem na infecção aguda; bradizoítos, localizados em cistos teciduais e presentes na infecção crônica e oocistos, produto final da reprodução sexuada e que ocorre somente no trato digestório dos felídeos, seus hospedeiros definitivos. Os oocistos são eliminados para o meio ambiente juntamente com as fezes dos felídeos onde, após esporulação, tornam-se infectante como descrito na Figura 1 (MILLER et al., 1972).

Após a ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, a parede cística é destruída por enzimas proteolíticas do estômago e do intestino delgado. Os bradizoítos são liberados e penetram na parede intestinal, iniciando o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii*. Ocorrem cinco estágios evolutivos enteroepiteliais, ou esquizontes distintos, tipo A, B, C, D e E (FERGUSON, 2004; SPEER & DUBEY, 2005; DUBEY, 2009; FERGUSON, 2009).

A disseminação ocorre pelo rompimento das células infectadas seguidas da invasão das células vizinhas, distribuindo-se praticamente por todo organismo via circulação sanguínea. Em tais circunstâncias pode ainda, difundir-se de uma célula a outra, ou ainda, ser disseminados por macrófagos, linfócitos ou granulócitos, além de circular na corrente sanguínea na forma livre. Somente as células nucleadas são parasitadas por taquizoítos, os quais possuem uma maior afinidade pelos sistemas musculares e nervosos, onde se multiplicam com rapidez até destruí-las (MILLER et al., 1972; DUBEY e FRENKEL, 1972).

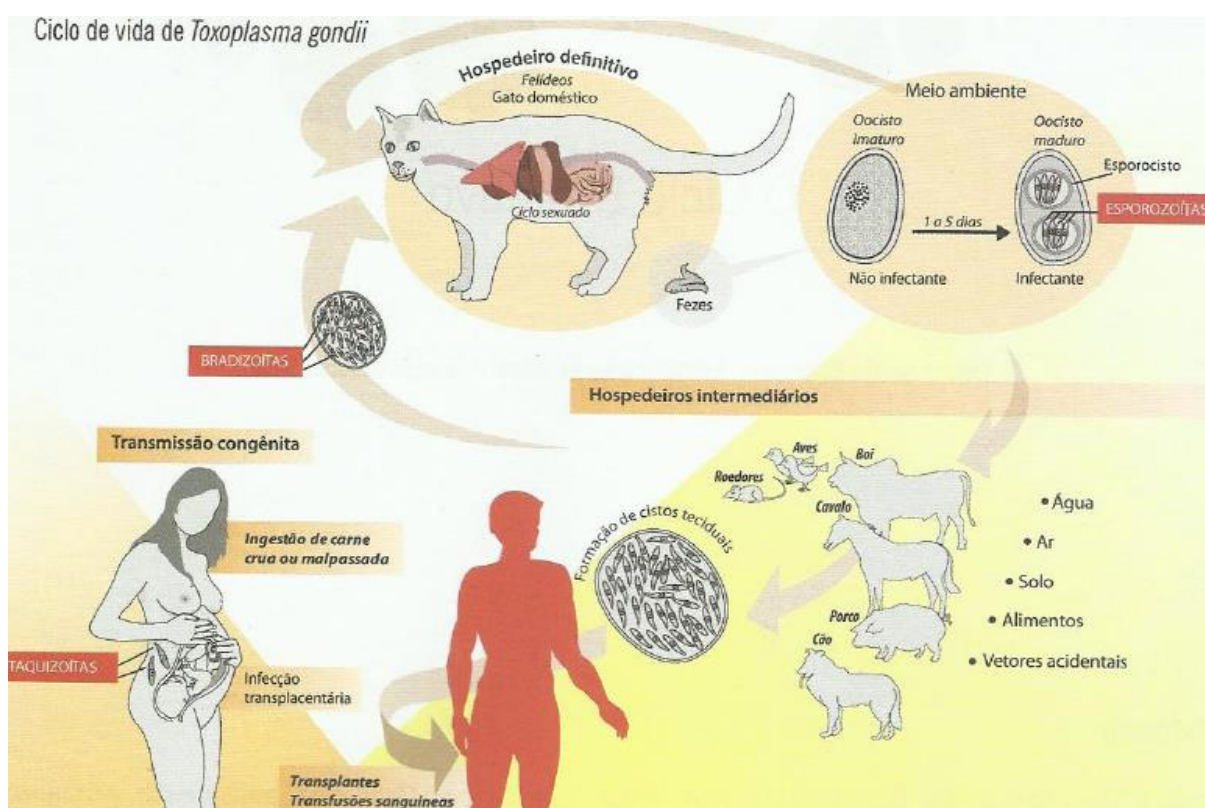


Figura 1. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*: vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos (MOURA, AMENDOEIRA & BARBOSA, 2009).

Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, de ocorrer a retro-conversão de bradizoítos em taquizoítos, fazendo com que o hospedeiro volte a manifestar a fase aguda da doença e, conseqüentemente, ter disseminação de cistos teciduais para novos órgãos (RUSSEL et al. 2002; DARDÉ, 2004),

As conseqüências da transmissão transplacentária ou congênita irá depender da idade gestacional no momento da infecção, variando desde o aborto a lesões

neurológicas ou oculares no nascimento, ou ainda pode ocorrer uma infecção latente, no qual os sinais clínicos irão se manifestar meses ou anos após o nascimento (MONTROYA & LIESENFELD, 2004; KRAVETZ & FEDERMAN, 2005).

Quando a toxoplasmose é adquirida pela gestante no primeiro trimestre, a incidência da infecção crônica é muito baixa (4,5%) e se eleva nos dois últimos trimestres 17,3% e 75%, respectivamente. O grau de severidade vai depender da idade fetal, quando associada ao início da gestação é caracterizada por abortamentos ou sequelas mais severas, quando a infecção congênita ocorre tardiamente as sequelas são relativamente menos severas (AMENDOEIRA & CAMILLO-COIRO, 2010).

No entanto, foi observado que mulheres que já apresentavam soropositividade antes da gravidez geralmente não transmitem a doença a seus fetos. Quando a infecção materna ocorre no primeiro trimestre da gestação, a ocorrência de transmissão vertical é menor que no terceiro trimestre, porém a gravidade da doença no neonato é maior (KASPER et al., 2002).

2.2 Toxoplasmose em Bovinos

O primeiro diagnóstico de infecção natural por *T. gondii* em bovinos foi na Alemanha por Houersdorf & Holtz (1952) citado por Sanger et al., (1953). A infecção em ruminantes ocorre pela ingestão de oocistos presente nos alimentos e solo contaminados (DUBEY, 1986). Em rebanhos a infecção pode estar consorciada a ingestão de grãos contaminados por oocistos deste parasito e estabulação de bovinos em alocações contaminadas com excretas de felídeos aumentando o risco de infecção (MEIRELES, 2001).

Os bovinos apresentam uma relativa resistência à infecção, visto que as ocorrências de cistos na musculatura são menos frequentes e permanecem por um menor período quando comparado a outras espécies (DUBEY, 1994).

O *T. gondii* aparentemente apresenta-se ser menos infectante para vacas em gestação quando comparados aos pequenos ruminantes, porcas e cadelas gestantes STALHEIM et al. (1980).

Isolamento parasitário e transmissão congênita foram comprovadas pela presença do *T. gondii* em fetos de vacas gestantes. Observaram que a sorologia é

um método eficaz para o diagnóstico e que títulos ascendentes indicam a infecção recente (AMATO NETO et al., 1995). Amostras de soro de rebanho leiteiro pela RIFI encontraram resultados de positividade de 48,51% e 26,00% no estado do Paraná, respectivamente (MARANA et al. 1995; OGAWA et al. 2005).

Em estudo de prevalência de anticorpos anti-*T.gondii* em bovinos utilizando a RIFI, foi comprovada maior titulação foi de 4046 (49%) e os títulos mais frequentes foram 128 (80,10%) e 256 (73,94%), cerca de 98% dos bovinos apresentaram titulações menores ou iguais a 1024, o que possibilita inferir a infecção crônica da doença e presença de cistos teciduais que podem permanecer por períodos de até 1191 dias nos bovinos (DUBEY e THULLIZ, 1993).

Estudos realizados com infecções experimentais por diversas vias de inoculação e diversos estádios (oocistos, bradizoítos, taquizoítos e cistos teciduais) do *T. gondii* em bezerros descrevem como principais sintomatologias hipertermia, distúrbios respiratórios, secreções ocular e nasal, hiperemia de conjuntiva (COSTA et al., 1977).

COSTA et al., (1977) em bezerros infectados com oocistos e cistos de *T. gondii* administrados por via oral, demonstraram parasitemia até 62 dias após a infecção e detectados anticorpos anti-*Toxoplasma* por meio dos testes de corante de Sabin-Feldman e pela RIFI.

A presença de *T. gondii* em tecidos reprodutivos e amostras seminais de bovinos infectados com oocistos e taquizoítos, pela metodologia da bioprova e PCR (Reação em cadeia de polimerase) sugerindo a ocorrência da transmissão sexual de *T. gondii* na espécie bovina SCARPELLI et al.,(2009).

2.3 Importância dos Crioprotetores na manutenção de espécimes

As mudanças cíclicas de temperaturas do sistema de criopreservação em ultras-baixas temperaturas, variando de -196°C até -100°C podem acarretar na morte dos microrganismos estocados, fato que pode ser associado a movimentação e transporte de amostras criopreservadas (VYSEKANTSEV et al., 2005).

À medida que a temperatura se aproxima de 0°C, a atividade celular é interrompida, resultando na redução do seu metabolismo e, conseqüentemente,

elevação da viabilidade da célula após o descongelamento as funções orgânicas são retomadas (BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

Os agentes crioprotetores exercem função de redução do estresse físico e químico oriundo do congelamento e do degelo das células. Para que um crioprotetor seja considerado ideal em suas características físico-químicas, deve ser de baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (LIMA, 2011).

MERYMAN (1971) classificou os aditivos quanto sua capacidade de penetração em materiais biológicos, em dois grupos crioprotetores penetrantes ou intracelulares - metanol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilformaldeído, metilacetamida, DMSO (dimetilsulfóxido) e glicerol; e crioprotetores não penetrantes ou extracelulares - mono, oligopolissacarídeos, manitol, sorbitol, dextrana, metilcelulose, polietilenoglicol.

Dimetilsulfóxido (DMSO) – $(CH_3)_2SO$ é um composto polar com peso molecular de 78,13 g/mol que demonstra propriedades radioprotetoras aos organismos (FERNANDES et., 2002). O grupamento S-O (sulfóxido) presente em sua molécula é quimicamente inerte, caracterizado por sua alta eficiência e rápida penetração celular. Os primeiros relatos da atividade crioprotetora do DMSO foram em estudos com eritrócitos e espermatozoides e, de forma gradual, foi se inserindo na criopreservação de microrganismos (MASSUMOTO, 1997; HUBÁLEK, 2003).

Os resultados na utilização do DMSO em algumas espécies de protozoários se apresentam melhores em comparação a outros agentes crioprotetores, como por exemplo, *T. gondii* (DUMAS, 1974), *Leishmania tropica* (CALLOW & FARRANT, 1973) e *Babesia* spp. (HENTRICH & BOSE, 1993; HUBÁLEK, 2003) outros exemplos também estão descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Registros de preservação do *Toxoplasma gondii* em várias temperaturas com ou sem crioprotetor.

Espécie	Estágio do Parasito	Temperatura de armazenagem (°C)	Crioprotetor	Período de Estocagem (Dias)	Autores
<i>Toxoplasma gondii</i> (RH)	Taquizoítos	-20	Glicerol	75	Myata, 1973b
		-20	S/C	1	Myata, 1973b
		-75	S/C	30	Miyata, 1973b
<i>Toxoplasma gondii</i>	Taquizoítos	-70	Glicerol	711	Mackie, 1972
		-75	DMSO	730*	Kwantes et al., 1967
		-196	DMSO	450*	Ressler et al., 1965
		-196	Soro	160	Smith, 1973
<i>Toxoplasma gondii</i>	Oocisto	-20	S/C	28	Frenkel & Dubey, 1973
<i>Toxoplasma gondii</i>	Cisto	-20	S/C	200	Robl, 1965
		-75	DMSO	730*	Kwantes et al., 1967

* Aproximadamente estimada a partir da data mostrada em semanas, meses ou anos.

S/C- Sem crioprotetor.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

HUBÁLEK (2003) descrevem que as concentrações de DMSO como crioprotetor variam de 1 a 32%.

AGUIAR et al., (2012) destacam a escassez de estudos na área de criopreservação de muitos microrganismos, aliado à expressiva importância da estocagem microbiológica.

2.4 Importâncias dos Crioprotetores na manutenção de Sêmen

As funções desempenhadas pelos crioprotetores no congelamento de sêmen de diversas espécies correspondem a evitar a formação de cristais grandes de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico através da reposição de água para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelamento da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (MEDEIROS et al., 2002).

Dentre os crioprotetores alcoólicos utilizados para a criopreservação espermática, destacam-se, o glicerol, o etilenoglicol e o DMSO (FICKEL et al.,

2007); entre as amidas, citam-se a acetamida, a lactamida (KASHIWAZAKI et al., 2006), a dimetilformamida (OLIVEIRA et al., 2006) e a dimetilacetamida (CALDERAM et al., 2008).

VISWANATH et al. (2000) verificaram que os componentes básicos dos diluentes de congelamento correspondem a substâncias iônicas e não-iônicas que mantêm a osmolaridade e tamponam o meio; a gema de ovo e o leite atuam como uma fonte de lipoproteína de alto peso molecular para proteger contra o choque térmico; açúcares, glicerol, 1,2-propanodiol ou dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetores; e outros aditivos como enzimas antioxidantes e antibióticos.

A utilização de DMSO na tentativa de substituir o glicerol na criopreservação de sêmen vem demonstrando bons resultados, principalmente em espécies de peixes, o DMSO na concentração de 10% e 5% demonstram resultados satisfatórios em algumas espécies com altas taxas de motilidade pós-descongelamento (MURGAS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; SANCHES et al. 2008).

O DMSO na concentração a 4% obteve resultados equivalentes ao glicerol no congelamento de espermatozoides de galos (FONTGIBELL e FRANCESCH, 1998). Em relação a espécies mamíferas, KUNDU et al. (2001) obtiveram bons resultados na associação de glicerol e DMSO na espécie caprina.

Devido ao incremento da inseminação artificial no Brasil é de grande importância a sanidade das amostras de sêmen criopreservado, que se utilizam dos mesmos crioprotetores destinados à manutenção de amostras de organismos patogênicos e zoonóticos, entre os quais o *T. gondii*. Tal fato pode viabilizar a disseminação da toxoplasmose a partir de sêmen colhido de reprodutores portadores de infecção toxoplasmica (aguda ou crônica).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a viabilidade da transmissão sexual experimental do *T. gondii* em vacas reprodutoras, sorologicamente negativas para *T. gondii*, submetidas à inseminação artificial com sêmen criopreservado e contaminado experimentalmente com taquizoítos deste coccídio e criopreservado de acordo com a biotécnicas utilizadas na reprodução de bovinos, fato inédito na literatura consultada.

3.2 Específicos

3.2.1 Machos:

Pesquisar a conservação e sobrevivência do *T. gondii* no sêmen criopreservado com DMSO por 24 horas e congelado no nitrogênio líquido (-196°C), para aplicação da biotécnica da inseminação artificial em tempo fixo.

3.2.2 Fêmeas:

Monitorar clínica e laboratorialmente vacas, em idade reprodutiva, expostas à inseminação artificial por sêmen criopreservado e contaminado experimentalmente com *T. gondii*.

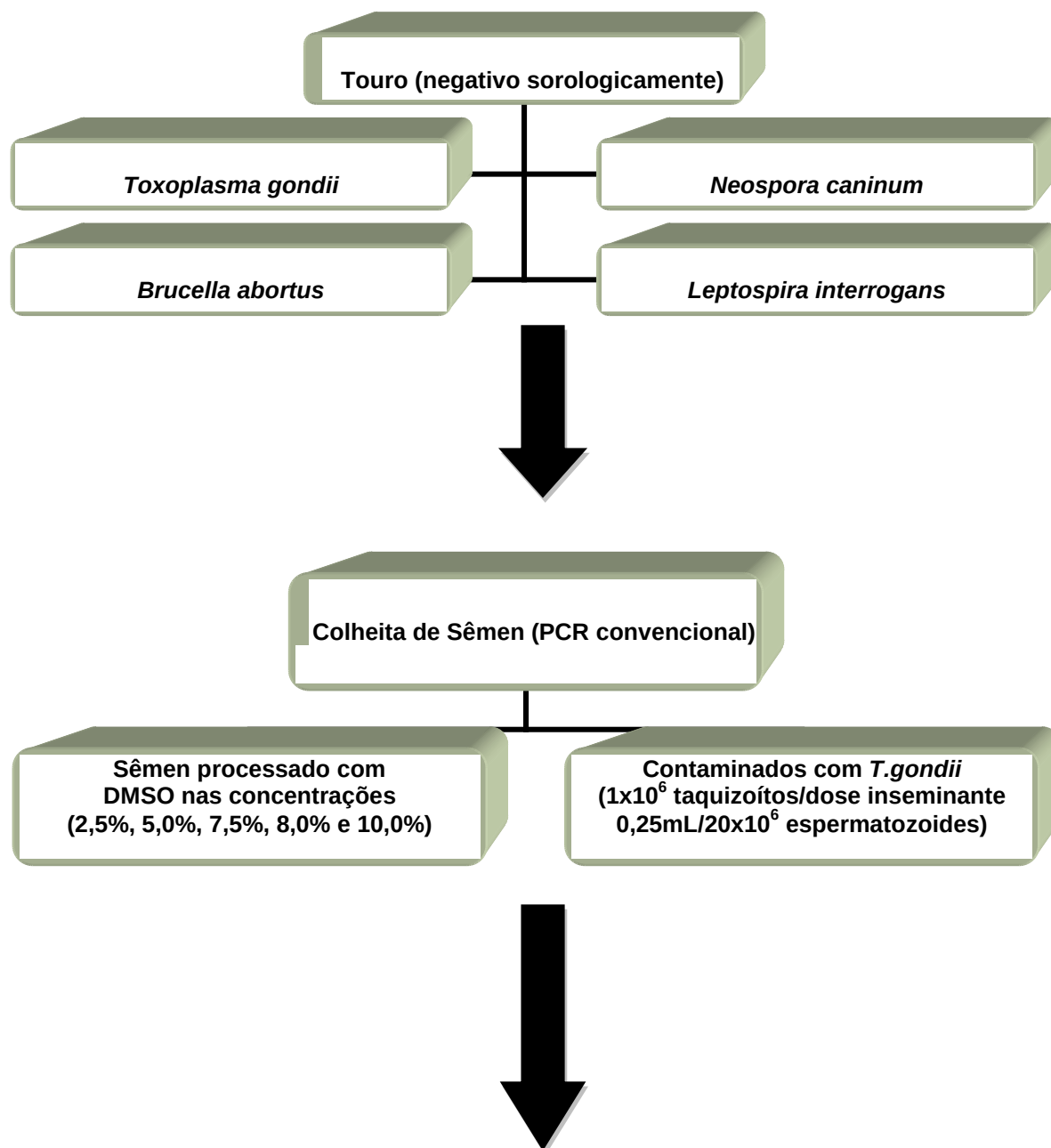
Avaliar por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a resposta imune humoral das fêmeas pós-inseminação artificial.

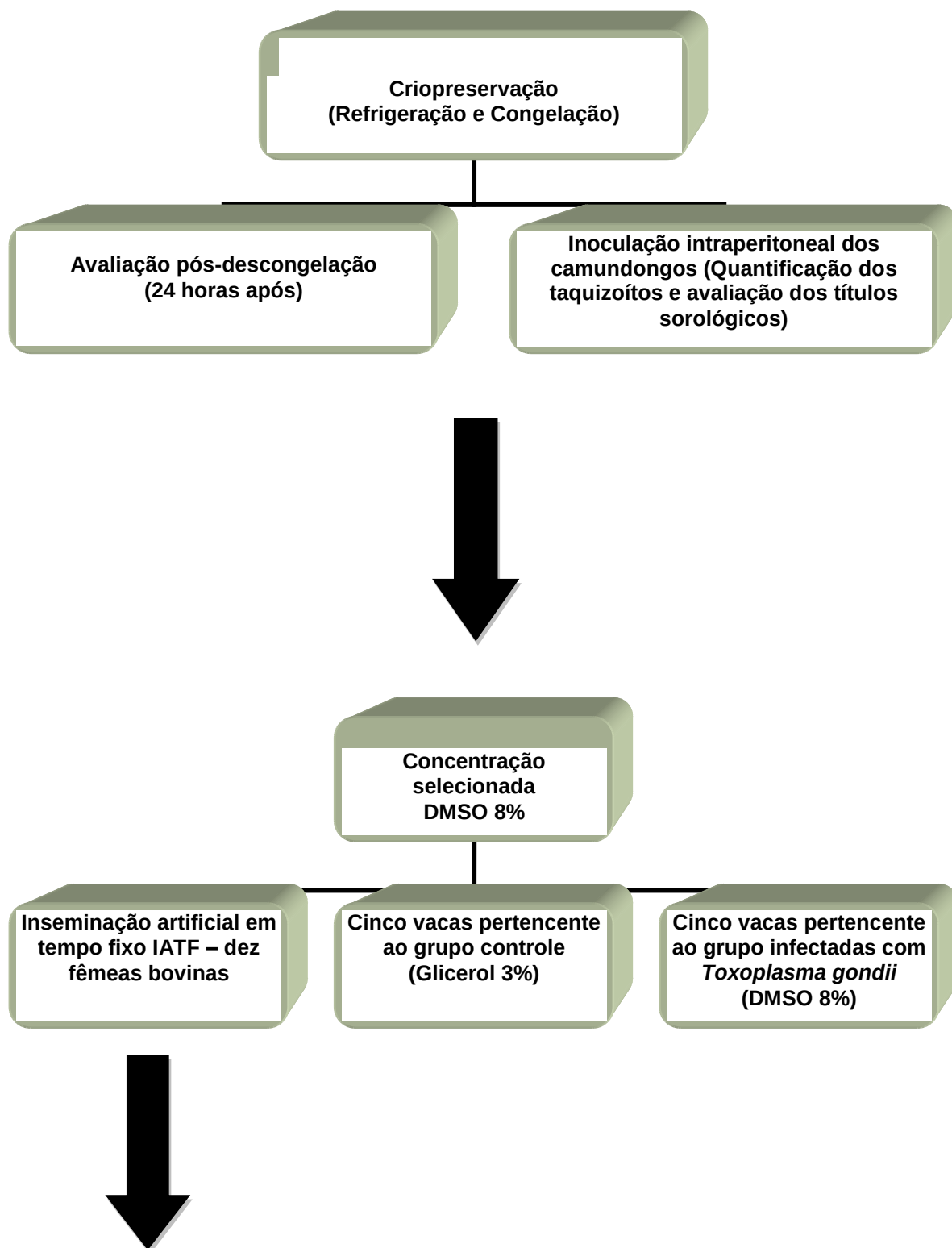
Pesquisar a presença de *T. gondii* em tecidos de vacas submetidas à IATF, utilizando sêmen contaminado por este protozoário, por meio da bioprova e *nested* PCR.

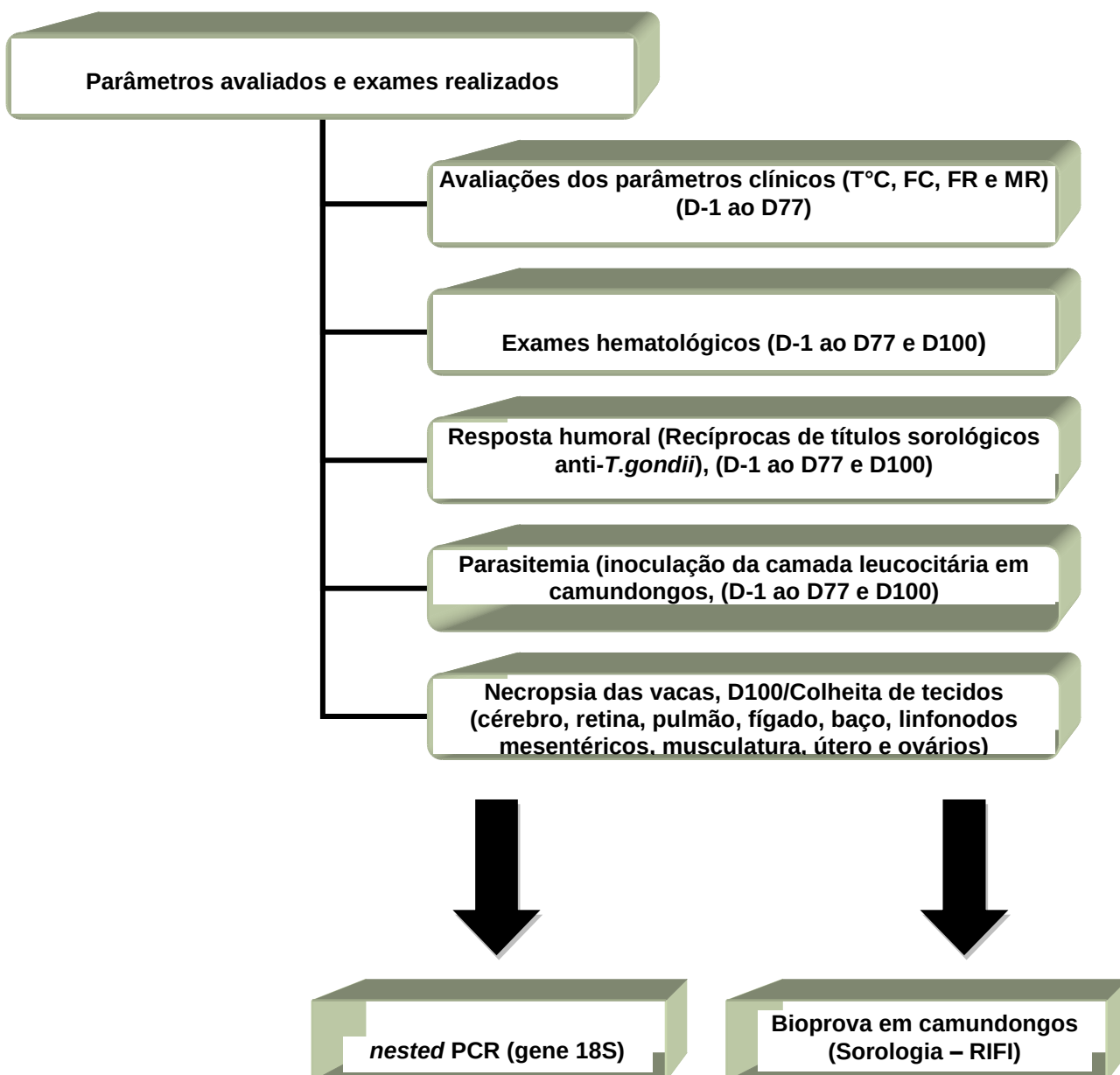
Inferir a ocorrência ou não da transmissão, por inseminação artificial, de *T. gondii* na espécie bovina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cronograma das atividades realizadas







4.2 Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA)

Este estudo foi realizado obedecendo todos os requisitos de bem estar e saúde animal. Para isso foi utilizado o menor número possível de indivíduos por grupo experimental.

Todo manejo das fêmeas bovinas experimentais foram realizadas de acordo com o projeto previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ FCAV/ UNESP, Campus Jaboticabal, SP (Protocolo nº 026341/13).

4.3 Amostra de *T. gondii*

Foi utilizada a amostra "RH" isolado tipo I (SABIN, 1941), mantida por meio de periódicas replicações intraperitoneais de taquizoítos em camundongos suíços albinos (*Mus musculus*), de 20 e 25 g de peso corpóreo, mantidos ao "CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Câmpus de Jaboticabal.

4.4 Obtenção dos taquizoítos de *T. gondii*

Para a obtenção dos taquizoítos e padronização dos inoculo que posteriormente foram adicionados ao sêmen bovino, procedeu-se da seguinte forma: camundongos albinos suíços, fêmeas, com idade de 35 dias, receberam, por via subcutânea, exsudato peritoneal (contendo *T. gondii*) colhidos de outros camundongos previamente inoculados com taquizoítos de *T. gondii* da amostra RH. Frequentemente, alguns destes camundongos foram eutanasiados e posicionados em decúbito dorsal. Após o acesso à cavidade abdominal, foi feito um lavado intraperitoneal com injeção de 1,0 mL de solução salina fisiológica estéril e posterior aspiração deste conteúdo. Com o auxílio de microscopia de luz (objetiva de 40X), a concentração, viabilidade e morfologia dos taquizoítos foram avaliadas para obtenção dos inóculos. A padronização desta metodologia permitiu a obtenção de taquizoítos, em concentrações variadas, presentes no exsudato intraperitoneal dos camundongos previamente infectados por *T. gondii* (COSTA et al., 1977).

4.5 Confeção das lâminas com antígenos para RIFI

Para a realização da RIFI foram utilizados, como antígeno, taquizoítos da amostra RH de *T. gondii*, mantidos em solução salina estéril acrescida de heparina (25 mL de heparina sódica em 50 mL de solução salina), obtidos de camundongos no segundo dia pós-infecção e inativados por formol a 0,5%, em estufa a 37°C por 30 minutos. Após centrifugação (um minuto a 160 g), para sedimentar as impurezas, o sobrenadante recolhido foi novamente centrifugado (10 minutos a 2000 g), sendo descartado o novo sobrenadante. O sedimento foi então ressuspensão em PBS e centrifugado mais uma vez. Após nova ressuspensão do sedimento, o mesmo foi avaliado (microscopia óptica, objetiva de 40X) pela quantificação de taquizoítos e então diluído em PBS até obter-se uma média de 20 a 30 taquizoítos por campo. Dez microlitros desta suspensão de taquizoítos foram colocados em “poços” (impressos em lâminas de microscopia pela técnica de “Silk Screen”). As lâminas contendo o antígeno foram mantidas à temperatura ambiente (“overnight”), cobertas para evitar contaminação por poeira, para secarem. Em seguida, as mesmas foram envoltas em papel alumínio e estocadas a -20°C até a utilização.

PARTE I: MACHOS – (MATERIAL E MÉTODOS)

4.6 Seleção do Bovino macho reprodutor experimental

Foi selecionado um bovino macho, mestiço (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), sorologicamente negativo para (*T.gondii*, *N. caninum*, *Brucella abortus*, *leptospira interrogans*, BVD (Diarréia viral bovina) e IBR (Rinotraqueíte infecciosa bovina)), clinicamente saudável, com idade de oito anos.

Amostras de sangue de 50 bovinos, em idade reprodutiva, foram colhidas por venopunção jugular, em tubos de *vacutainer*, sem anticoagulante. O material foi centrifugado a 1000g, por 10 minutos, e os soros obtidos foram estocados a -20°C, até o processamento. A técnica sorológica empregada para detecção de anticorpos contra *T. gondii* foi a RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta (CAMARGO, 1964), utilizando-se de conjugado anti-IgG específico para bovinos (Sigma Chemical – F7887), marcado com isotiocianato de fluoresceína, sendo considerados como

amostras positivas os soros que apresentarem títulos iguais ou superiores a 64. Foi empregada também, a RIFI para detectar a presença de anticorpos contra *Neospora caninum* (CONRAD et al. 1993; DUBEY & LINDSAY 1996; SOARES et al., 2009) sendo os soros dos animais usados nas diluições de 1:200. Os bovinos com títulos sorológicos a partir de 50, foram considerados positivos (FIGLIUOLO et al., 2004) e, conseqüentemente, descartados do experimento. Para pesquisa de anticorpos contra brucelose foi utilizada a Técnica do Antígeno Acidificado Tamponado, também conhecido como Teste do Rosa Bengala ou “*Card Test*” (ALTON et al., 1988). Foi testado somente o antígeno *Brucela abortus*.

Quanto à detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. leptospirose, a técnica empregada foi a Prova de Soroaglutinação Microscópica. Os soros foram testados contra os sorovares *wolffi*, *hardjo*, *patoc*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae* e *canicola*. Para a realização da técnica e interpretação do grau de aglutinação foram adotadas as recomendações do CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES (1985).

4.6 Colheita de sêmen do bovino reprodutor

Durante esta fase pré-experimental, os bovinos foram submetidos à colheita de sêmen por eletroejaculação para obtenção de sêmen para criopreservação.



Figura 2. (A) eletroejaculador; (B) “probe” para bovinos; (C) “kit” para colheita de sêmen; (D) Limpeza retal e massagem prostática, preparando o touro para a colheita de sêmen.

4.7 Detecção do DNA de *T. gondii* pela PCR

Após a colheita do sêmen, foram retiradas alíquotas para confirmação da presença/ausência do DNA de *T. gondii* (cPCR). A reação em cadeia pela polimerase foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos TOX4 e TOX5, amplificando uma região de 529 pares de base (pb), Homan et al. (2000).

O sêmen foi homogeneizado e foram utilizadas alíquotas de 200 µL para a extração de DNA, o kit utilizado para extração foi Illustra blood cells genomic Prep Mini Spin (GE HealthCare®).

A quantificação do DNA foi realizada no Nanodrop utilizando como referência a relação 260/280 e 230/280, que deve estar em aproximadamente 1,8. Acima disso pode ser uma contaminação com Rna. Caso fosse necessário, a extração seria repetida. O gene endógeno utilizado foi o gene repetição (aproximadamente 300 repetições).

As reações de PCR foram realizadas com volume total de 25µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8,0, 50mM KCl, 1,5mMMgCl₂, 0,2mM de dNTP, 10pM de cada primer, 0,5 unidade de Taq Platinum (Invitrogen) e 10ng de DNA. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Perfil de ciclagem: Desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por minuto, com extensão final a 72°C durante 10 minutos. O produto amplificado para esse ciclo é de 529 pares de bases.

Alíquotas de 5µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x, adicionado de 3µL/50 mL de gel Nancy 520 DNA Gel Stain - Sigma-Aldrich. A corrida foi realizada inicialmente a 80V durante 5 minutos, seguida de 100V por 60 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado em sistema de fotodocumentação digital, Sistema Gel-Doc it18, sob luz ultra-violeta, e fotografado.

4.8 Inoculação de taquizoítos de *T.gondii* no sêmen

Após a seleção do touro foi realizada a colheita de sêmen por meio de vagina artificial, uma alíquota foi retirada para exame andrológico para diagnóstico dos parâmetros de normalidade. A seguir a amostra seminal foi submetida a etapa de diluição do sêmen, essa diluição corresponde a adição de TRIS, frutose, gema de ovo, estreptomicina e o crioprotetor DMSO nas concentrações 2,5%, 5,0%, 7,5%, 8,0%, 10,0% e sem adição de DMSO, em seguida foram alíquotados o volume de cada palheta de 0,25 mL, contendo um total de 20×10^6 espermatozoides, que foram contaminados com 1×10^6 taquizoítos. A curva de resfriamento foi de quatro horas, após esse período o sêmen foi submetido ao processo de congelamento no vapor de nitrogênio (-150°C) por 15 minutos e em seguida mergulhado diretamente ao nitrogênio líquido (-196°C) por 15 segundos e acondicionados em botijão de nitrogênio líquido. Após 24 horas as palhetas foram descongeladas a 35°C por 20 segundos e foi realizada a inseminação artificial em tempo fixo.

4.9 Análise da Viabilidade e Infectividade do *T. gondii* nas Amostras Seminais Criopreservadas

Para investigar a viabilidade e infectividade do *T. gondii* e qual a melhor concentração de DMSO a ser utilizada nas amostras de sêmen criopreservadas, utilizou-se a metodologia proposta por Teale et al., (1982), modificada.

Foram utilizadas 70 palhetas de sêmen, as quais foram descongeladas (banho-maria a 35°C por 20 segundos) 24 horas após a criopreservação do sêmen processado com DMSO nas concentrações supracitadas no item 4.8. Dez camundongos foram inoculados (via intraperitoneal), cada um, com o conteúdo total de uma palheta (0,25 mL) de sêmen diluída em igual volume de PBS. O delineamento experimental pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2. Delineamento experimental das principais concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) que foram testados para aferir a viabilidade e infectividade do *Toxoplasma gondii* e do sêmen, CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.

Grupo	Concentração (%)	Taquizoítos/Dose	Camundongos
Experimental	de DMSO	Seminal	Inoculados
I	2,5	1×10^6	10
II	5,0	1×10^6	10
III	7,5	1×10^6	10
IV	8,0	1×10^6	10
V	10,0	1×10^6	10
VI (Controle)	5,0	–	10
VII	–	1×10^6	10

Todos os camundongos que vieram a óbito, foram submetidos à lavagem da cavidade peritoneal. Foi possível recuperar grande quantidade de taquizoítos de *T. gondii* de todos os animais. Todos os lavados peritoneais obtidos foram centrifugados (1500 *g* por um minuto) para sedimentação de células do camundongo. A seguir, foram fixados com formol, na concentração final de 2%, em estufa (37°C), por 30 minutos. Para retirar o formol, os lavados foram submetidos a duas centrifugações (1500 *g* por 10 minutos cada), sendo o “pellet” ressuspenso em PBS. Logo após, foi determinada a concentração de taquizoítos nas suspensões, por meio de contagem em câmara de Neubauer, para estimativa da quantidade total de taquizoítos presentes na cavidade abdominal dos camundongos e, assim, avaliar o grau de infecção.

Além da pesquisa de taquizoítos no exsudato peritoneal, todos os camundongos tiveram amostras de sangue colhidas por punção cardíaca e os soros

submetidos à RIFI, para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii*, sendo considerados positivos quando reagentes na diluição 1:16, em ambos os casos. Todos os soros reagentes foram submetidos à titulação, com razão dois, até a diluição onde não mais se apresentassem reagentes.

PARTE II: FÊMEAS – (MATERIAL E MÉTODOS)

4.10 Seleção das vacas reprodutoras experimentais para realização da Inseminação artificial em tempo fixo – (IATF)

Foram colhidas amostras sorológicas de 388 vacas pertencentes a diversas propriedades do município de Jaboticabal (latitude 21° 15' 17" S e longitude 48° 19' 20" W), Monte Alto (latitude 21° 15' 40" S e longitude 48° 29' 47" W) e Guataporã (latitude 21° 29' 48" S e longitude 48° 02' 16" W), no estado de São Paulo, das quais foram selecionadas dez fêmeas bovinas (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) com idade reprodutiva $\geq$ quatro anos, sorologicamente negativas para *Brucella abortus*, *N. caninum* e *T. gondii*.

A distribuição dos animais em um dos dois grupos experimentais ocorreu de acordo com o peso corporal ao início do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo – (IATF).



Figura. 3. Fêmeas bovinas selecionadas no setor de bovinos do CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.

4.11 Brucelose

As amostras sorológicas foram encaminhadas ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal-SP, foram submetidas à Técnica do Antígeno Acidificado Tamponado (ATT) ou “*card test*”, para pesquisa de anticorpos contra *Brucella abortus*.

Todos os 388 soros examinados mostraram-se negativos para presença de anticorpos contra *B. abortus*.

4.12 Leptospirose

As amostras sorológicas também encaminhadas ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP/FCAV campus Jaboticabal-SP, foram examinados por microscopia de campo escuro e soroaglutinação microscópica (SAM), conforme recomenda a Organização Mundial de Saúde (OMS), para diagnóstico de leptospirose humana e animal.

Devido ao elevado número de sorovares para leptospirose e a dificuldade em encontrar animais negativos, ao iniciar o protocolo de inseminação em tempo fixo (IATF) as vacas foram submetidas ao tratamento profilático com dose única (25 mg/Kg) de estreptomicina Estreptomax® (Ourofino Saúde Animal) para que não ocorra nenhum diagnóstico diferencial em relação a infecção toxoplásmica, caso ocorresse algum abortamento.

4.13 Diarréia Viral Bovina (BVD) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

Utilizando-se da técnica de neutralização viral (Virusneutralização) amostra viral (BVDV-1 Singer/BoHV-1 Nebraska, linhagem celular: MDBK, para diagnóstico de BVD e IBR, foram identificadas diferentes titulações nos soros colhidos das vacas.

Após os exames supracitados podemos inferir que apenas 13,14% (BVD) e 7,73% (IBR) amostras sorológicas apresentaram negatividade para a técnica de Virusneutralização apresentando títulos sorológicos máximos de 5120 (BVD) e 1024 (IBR).

Doenças IBR e BVD foram relevadas para o presente estudo por serem endêmicos no Brasil (KRAMPS et al., 1999; NETTLETON et al., 1995; MOREIRA et al., 2001; SAMARA et al., 2004).

4.14 Neosporose e Toxoplasmose

As amostras sorológicas colhidas das 388 vacas, examinadas no Centro de Pesquisa em Sanidade Animal – CPPAR/UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal-SP, foram submetidas à técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), com soropositividade pré-determinada IgG positiva para *N. caninum* (1:200) – Kit Imuno Teste (Imunodot®) e *T. gondii* (1:16 ou 1: 64), respectivamente.

Das 388 amostras de soros examinadas foram positivas 12 amostras com presença de anticorpos contra *N. caninum* e 42 amostras positivas *T .gondii*.

4.15 Sincronização de Cio e Inseminação artificial em tempo fixo

Antes do processo de inseminação artificial em tempo fixo, as fêmeas foram avaliadas por ultrassonografia para determinar o *status* reprodutivo, levando em consideração a presença ou não de corpos lúteos e de cistos e receberam uma dose única de 20 mL/ 25 mg de estreptomicina (Estreptomax®, Ourofino, Cravinhos, Brasil) via intramuscular, de forma profilática contra leptospirose. Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as vacas receberam 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino, Cravinhos, Brasil), via intramuscular e um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos,Brasil). No D8 os animais foram submetidos a tratamento, pela via intramuscular e receberam: 530 µg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ourofino, Cravinhos, Brasil), 300 UI de Gonadotrofina coriônica equina (SincroeCG®, Ourofino, Cravinhos, Brasil) , 1 mg de Cipionato de estradiol (SincroCP®, Ourofino, Cravinhos, Brasil) e o dispositivo intravaginal foi removido. A IATF foi realizada 48 horas após a retirada do dispositivo.

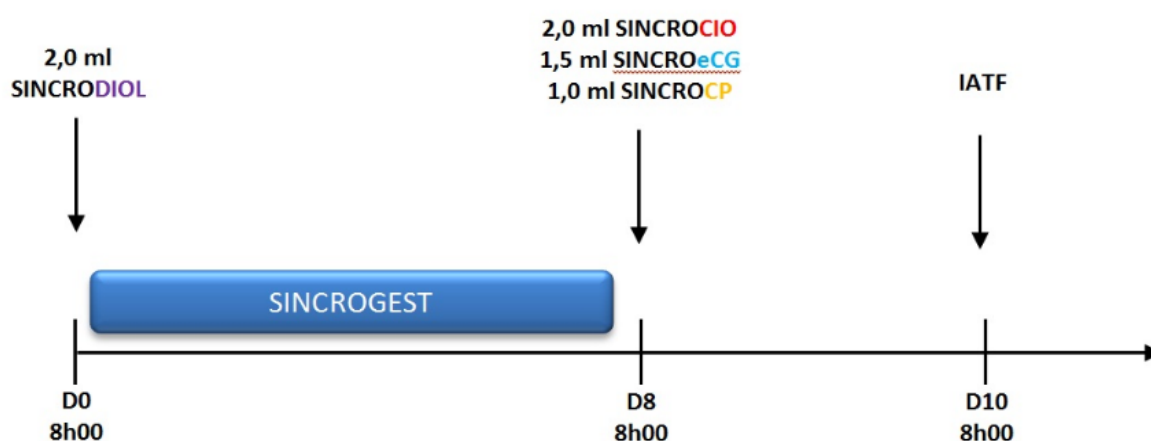


Figura 4. Protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

4.16 Inseminação Artificial em Tempo Fixo com sêmen contaminado por *Toxoplasma gondii*

Após o período de adaptação de 30 dias e sincronização de cio, as 10 vacas selecionadas foram identificadas e inseminadas artificialmente em tempo fixo (IATF). O delineamento experimental foi composto por dois grupos (Controle x *Toxoplasma*), com cinco repetições cada, sendo um grupo inseminado com amostra seminal crioprotetido com glicerol 3%, livres de *T. gondii* (controle). No segundo, vacas soronegativas foram inseminadas com sêmen contaminado artificialmente com *T. gondii* e criopreservado com DMSO 8%.

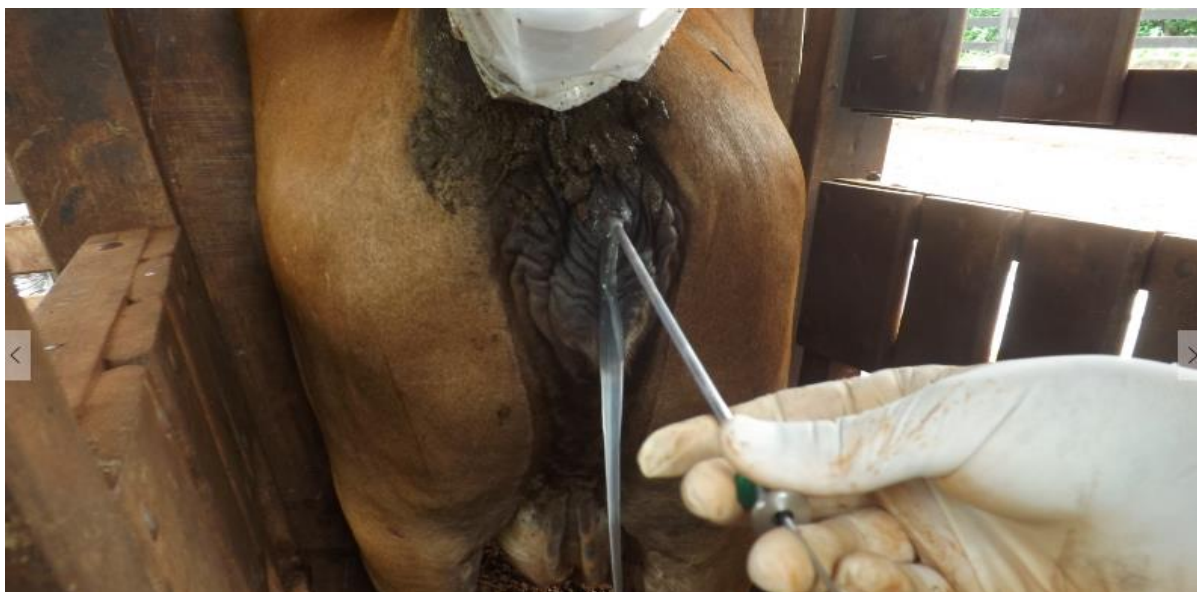


Figura 5. Fêmea bovina Nº1807, sendo inseminada no último dia do protocolo de IATF. CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.

4.17 Exames clínicos e laboratoriais das Fêmeas

4.17.1 Parâmetros clínicos

Durante o período experimental (pós-inoculação), as fêmeas foram submetidas a exames clínicos (aferição das frequências cardíaca e respiratória e da temperatura retal), em todas as datas experimentais em conjunto, com as colheitas de sangue para avaliação da resposta imune humoral (1, 3, 5, 7, 12, 14). A partir desta data, tais exames foram realizados com intervalo de sete dias até o 77º DPI.

4.17.2 Resposta imune humoral das fêmeas

Nos soros de todas as vacas, obtidos nos dias -7, -1, zero (antes da inseminação artificial) 1, 3, 5, 7, 12, 14 e, semanalmente, até a estabilização (cronificação) dos títulos sorológicos, pesquisado a presença de anticorpos específicos contra *T. gondii* pela RIFI (CAMARGO, 1964).

4.17.3 Determinação da parasitemia nas vacas

Nas amostras de sangue colhidas na mesma periodicidade do item anterior, foram determinados os surtos parasitêmicos por meio da inoculação de camadas leucocitárias em camundongos. Para tal, amostras de sangue (10 mL) das vacas foram colhidas em tubo esterilizado contendo EDTA, nas mesmas datas dos exames clínicos.

Após centrifugação (1500 g por 10 minutos), a camada leucocitária foi cuidadosamente aspirada com auxílio de pipeta e inoculada, intraperitonealmente, em grupos de cinco camundongos. Esses camundongos foram observados por 15 minutos após as inoculações para avaliar possíveis efeitos adversos à inoculação. Em seguida, avaliações diárias foram efetuadas até 42 dias pós-inoculação, para verificação de manifestações decorrentes de infecção toxoplásmica.

Nos camundongos que apresentaram aumento de volume abdominal ou que morreram até o 10º DPI, foi pesquisada a presença de taquizoítos de *T. gondii* por meio da microscopia do exsudato peritoneal e “*imprint*” de pulmão dos mesmos (Os sobreviventes então foram examinados quanto à presença de anticorpos para *T. gondii* pela RIFI). Naqueles que vieram a óbito, a partir do 11º até o 42º DPI, foi realizada a pesquisa de cistos (bradizoítos) de *T. gondii* (CAMARGO, 1964).

4.17.4 Necropsias das fêmeas bovinas

Após a estabilização (cronificação) dos títulos sorológicos da resposta imune humoral das fêmeas infectadas com sêmen contendo taquizoítos de *T.gondii*, foi obtida a confirmação da infecção por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Em média, essa cronificação em bovinos ocorre entre o 70º e 77º dia segundo SCARPELLI et al. (2009). As vacas que não apresentaram prenhez e cronificação do título sorológico pertencentes ao grupo II infectados com *T.gondii* foram eutanasiadas no 100º DPIA, de acordo com o “*Guidelines on Euthanasia of American Veterinary Medical Association AVMA* - (2013). Cada animal, recebeu como medicação pré-anestésica, pela via intramuscular, cloridrato de xilazina 2g na dose de 0,3mg/kg (1,5mL/100kg). Uma vez sedados ($\pm$ 15 minutos), foi administrada, pela via endovenosa, o tiopental sódico 1g (dissolvido em 20mL de

solução fisiológica estéril, o que corresponde à 20mL de solução à 5%), na dose de 5mg/kg (1g/200kg). Somente após ser constatada a inconsciência total do animal (ausência dos reflexos palpebrais e mastigatórios), foi realizada a sangria, onde, inicialmente, com uma faca apropriada foi feita a abertura sagital da barbeta, em seguida, o operador realizou a secção dos grandes vasos do pescoço. Pela abertura inicial, a faca foi introduzida em direção ao peito do animal, seccionando-se a aorta e veia cava ou, em algumas vezes, junção das artérias carótidas, de modo que, a morte do animal ocorreu por hipovolemia.

As carcaças das vacas eutanasiadas foram destinadas e descartadas por meio de compostagem, a cargo da FCAV/UNESP-Jaboticabal, de acordo com as recomendações descritas no ENVIRONMENTAL GUIDANCE DOCUMENT OF DISPOSAL OF ANIMAL CARCASSES (2010).

4.17.5 Bioensaio em camundongos

Para realização do bioensaio foi feito um “pool” de tecidos de predileção (cérebro, retina, pulmão, fígado, baço, linfonodos mesentéricos, musculatura esquelética-*Longissimus dorsi*, útero e ovários) para *Toxoplasma gondii* das vacas, que foram inoculados em camundongos (DUBEY, 1998).

O “pool” de tecidos foi homogeneizado com cinco volumes de NaCl 0,15 M (salina) utilizando um agitador magnético.

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

Após a incubação a suspensão foi coada por meio de duas camadas de gaze, o coado transferido para nove tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 1200 g/ 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de cada tubo foi então neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio a 1,2%, pH 8,3, recém-preparado (aproximadamente 5,0 mL/ tubo). A neutralização foi percebida visualmente pela mudança de cor do sedimento. Após homogeneização, o material foi transferido para um tubo Falcon único de 50 mL com solução salina e

centrifugado a 1200 g/10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado com salina contendo 2000 U de penicilina e 200 µg de estreptomicina por mililitro.

As amostras foram inoculadas imediatamente (1 mL/ camundongo), via intraperitoneal, em grupos de cinco camundongos.

Para realização do diagnóstico de infecção toxoplásmica, os camundongos foram observados durante seis semanas (COSTA et al., 1977) para avaliação de presença de sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose. Pesquisou-se ainda, a presença de anticorpos IgG-RIFI contra *Toxoplasma gondii* pela RIFI na diluição de 64 (CAMARGO, 1964), além de cistos cerebrais (DUBEY et al., 1998). Foram considerados sorologicamente positivos (RIFI), os soros de camundongos que apresentaram títulos ≥ 64 (CAMARGO, 1964).

4.17.6 Detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* nested PCR e eletroforese

Segundo metodologia descrita por Fuente et al. (1996), os tecidos colhidos das vacas foram processados separadamente e examinados pela técnica molecular *nested* PCR, realizada junto ao Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Higiene e Saúde Pública, FMVZ/UNESP, Câmpus de Botucatu-SP.

A extração do DNA (ácido desoxirribonucleico) de *T.gondii* de amostras teciduais (cérebro, retina, pulmão, fígado, baço, linfonodos mesentéricos, musculatura-*Longissimus dorsi*, útero e ovários) previamente armazenadas à -20°C, foi realizado utilizando-se o kit Illustra TM tissue e cells genomic Prep Mini Spin kit (GE Healthcare, EUA).

A PCR foi realizada com os primers externos para o gene 18S, Tg18s48F (5'CCATGCATGTCTAAGTATAAGC3') e Tg18s359R (5'GTTACCCGTCAGTCCAC3') e primers internos Tg18s58F (5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC3') e Tg18s348R (5'TGCCACGGTAGTCCAATAC3'). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos.

Para a eletroforese, alíquotas de 10 µl das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 3 µl de solução de bromofenol e submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x, adicionado de 2 µl de brometo de etídio. Adicionalmente as amostras, foi utilizado marcador de peso molecular (Life Technologies, EUA). A corrida foi realizada inicialmente a 80 volts por 60 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado em sistema de fotodocumentação digital (Sistema Gel-Doc it 18), sob luz ultravioleta e fotografado. O produto amplificado para *T. gondii* é de 290 pares de bases (SILVA; SU; LANGONI, 2009).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram testados quanto a hipótese de independência, normalidade e homocedasticidade. As diferenças entre as contagens dos taquizoítos recuperados dos exsudatos peritoneais dos camundongos da bioprova foram verificadas pelo teste de Kruskal-Wallis, em nível de confiança de 95%. As recíprocas dos títulos sorológicos (anticorpos das classes IgG e IgM) dos camundongos foram comparadas pelo teste Exato de Fisher, em nível de confiança de 95%.

Os dados das fêmeas (parâmetros clínicos) foram analisados em parcelas subdivididas pelo procedimento considerando efeitos fixos de tempo (controle/tratado), tempo e interação Proc Mixed do pacote estatísticos SAS, (2001) e as confrontações dos tratamentos foram obtidas pelo teste Tukey-kramer a 95% de confiança.

6. RESULTADOS

Das 388 fêmeas bovinas examinadas sorologicamente para brucelose, leptospirose, BVD, IBR, neosporose e toxoplasmose, apresentaram-se negativas para brucelose (95,62%), para neosporose, (96,90%), toxoplasmose, (89,18%), para leptospirose (13,14%) e 7,73% para BVD (Diarreia Viral Bovina) e IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina).

Vinte e quatro horas após o processo de criopreservação, uma palheta de cada uma das cinco concentrações de DMSO, nas soluções diluentes, foi descongelada em banho-maria (35°C por 20 segundos). Imediatamente, a amostra seminal foi submetida à análise de vigor e motilidade, sendo obtidos os maiores valores (vigor = 2 e motilidade = 20%) nos diluentes contendo DMSO nas concentrações de 7,5, 8% e 10%.

Tabela 3. Parâmetros espermáticos do sêmen bovino criopreservado em diluentes contendo diferentes concentrações de DMSO adicionado com 1×10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, após (24 horas) descongelamento. CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.

Parâmetros	Concentração do DMSO no Diluente				
	2,5%	5,0%	7,5%	8,0%	10,0%
Vigor (%)	1	2	2	2	2
Motilidade (%)	5	5	20	20	20

As concentrações de DMSO 7,5%, 8,0% e 10,0% foram as concentrações que se aproximaram dos parâmetros de qualidade do sêmen aceitos pra um touro com idade <34 meses, com motilidade de 30-60%, vigor de 3-4% (CBRA, 1998).

T. gondii manteve sua infectividade em todas as amostras seminais contaminadas com taquizoítos, inclusive na ausência de DMSO. A partir do 6º dia pós-inoculação (DPI) os camundongos (bioprova) pertencentes aos Grupos I, II, III, IV, V e VII, passaram a apresentar sintomatologia clínica compatível com toxoplasmose aguda, sendo que os sinais mais frequentes foram: apatia, pelos

arrepiados, ascite e diarreia. Todos os animais em questão vieram a óbito entre o 7º e o 9º DPI. Os animais do grupo VI (controle), por sua vez, sobreviveram os 42 dias da bioprova, não apresentando qualquer sinal clínico digno de nota. Apenas um dos camundongos, pertencente ao Grupo IV, veio a óbito no 3º DPI. O lavado da cavidade peritoneal apresentou-se com aspecto fortemente turvo e coloração amarelada. Microscopicamente, observou-se grande número de células inflamatórias e alguns poucos taquizoítos ativos. A *causa mortis* mais provável, portanto, foi peritonite infecciosa.

A Tabela 4 apresenta os dados referentes à mortalidade dos camundongos, bem como a contagem dos taquizoítos recuperados do exsudato peritoneal.

Tabela 4. Mortalidade dos camundongos submetidos à bioprova, média do tempo de sobrevida e taquizoítos recuperados dos exsudatos peritoneais. CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.

Grupo Experimental	Mortalidade		Média de Sobrevida	Taquizoítos (1×10^6)
	Mortos/Total	%	(Dias)	(Média $\pm$ DP) ²
I (2,5%)	10/10	100	8,4	$1,85 \pm 0,77^A$
II (5,0%)	10/10	100	8,0	$3,32 \pm 4,55^A$
III (7,5%)	10/10	100	7,6	$1,76 \pm 1,97^A$
IV (8,0%)	10/10	100	9,2	$3,53 \pm 5,61^A$
V (10,0%)	10/10	100	8,2	$1,40 \pm 0,19^A$
VI (Controle)	0/10	0	42 ¹	$0,00 \pm 0,00^B$
VII (S/ACP)	10/10	100	7,6	$3,11 \pm 2,46^A$

¹Grupo controle (Animais eutanasiados no 42º dia pós-inoculação).

²Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

S/ACP - Sem agente crioprotetor.

Todos os animais dos grupos I, II, III, IV, V e VII apresentaram soroconversão (RIFI). Em relação ao Grupo VI (controle), os camundongos foram eutanasiados (deslocamento cervical) após os 42 dias de observação, sendo que nenhum apresentou soroconversão pelo exame sorológico adotado. Os resultados, com as recíprocas dos títulos sorológicos dos camundongos, encontram-se compilados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados sorológicos obtidos em camundongos submetidos à bioprova. CPPAR/FCAV/UNESP, Brasil.

Grupo Experimental	Recíproca dos Títulos Sorológicos ¹									
	Anticorpos da Classe IgG				Anticorpos da Classe IgM					
	16	32	64	128	16	32	64	128	256	512
I (2,5%)	2 ^{AB}	4 ^A	4 ^A	0 ^A	2 ^A	4 ^A	4 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
II (5,0%)	4 ^A	4 ^A	2 ^{AB}	0 ^A	0 ^A	4 ^A	2 ^{AB}	2 ^A	0 ^A	2 ^A
III (7,5%)	0 ^B	4 ^A	5 ^A	0 ^A	0 ^A	2 ^{AB}	4 ^A	2 ^A	2 ^A	0 ^A
IV (8,0%)	0 ^B	5 ^A	4 ^A	0 ^A	2 ^A	4 ^A	4 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
V (10,0%)	0 ^B	4 ^A	5 ^A	0 ^A	2 ^A	4 ^A	4 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
VI (Controle)	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^A	0 ^A	0 ^B	0 ^B	0 ^A	0 ^A	0 ^A
VII (S/ACP)	2 ^{AB}	5 ^A	2 ^{AB}	1 ^A	0 ^A	5 ^A	4 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A

¹Valores seguidos das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ($p > 0,05$).

S/ACP - Sem agente crioprotetor.

A concentração de dimetilsulfóxido (DMSO) a nível de 8% (grupo IV) foi a que apresentou melhor média de replicação de taquizoítos, quantificados em lavado intraperitoneal e mensurados em câmara de Neubauer (média de $9,2 \times 10^6$).

Pelo conjunto de fatores de qualidade, recomendados em andrologia bovina e pela replicação (infecção) na bioprova em camundongos, esta concentração foi eleita para ser utilizada no presente estudo.

Nas Figuras 6, 7, 8 e 9 estão registrados respectivamente, todos os dados clínicos (temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória) aferidos nas vacas experimentais. Os parâmetros de normalidade foram baseados nas citações de Feitosa, (2014) descritos na Tabela 9 (anexos).

A temperatura retal média das vacas pertencentes ao grupo controle variou de 38,2 à 39,4°C durante todo período experimental. No grupo de vacas inoculadas com taquizoítos de *T. gondii*, a média de temperatura retal variou de 38,2 à 39,2°C (Figura 6).

As frequências cardíacas médias das vacas, nas diferentes datas experimentais, apresentaram variações de 72,4 a 101,2 bpm nos animais pertencentes ao grupo controle e de 73,3 a 94,8 bpm no grupo submetidos a IATF com sêmen contendo 1×10^6 taquizoítos de *T. gondii* com a amostra “RH” de *T. gondii* (Figura 7), não foi diagnosticada individualmente taquicardia em nenhum animal de ambos os grupos experimentais.

Na Figura 8 estão registrados as frequências respiratórias médias obtidas nas vacas variaram de 23,1 a 47,3 movimentos por minuto (grupo controle) e de 18,5 a 41,3 movimentos para os inoculados (Figura 8). Alterações dos parâmetros de frequência respiratória (taquipnéia) foram diagnosticados em ambos os grupos.

Em relação aos movimentos ruminais avaliados ambos os grupos, controle e infectados, não apresentaram nenhuma alteração digna de nota (Figura 9).

Analisando os dados de temperatura retal por animal, de acordo com os parâmetros de normalidade recomendados por Feitosa (2014), observou-se hipertermia (39,8°C) febrícula na vaca nº 0813 (D5) pertencentes ao grupo infectado com *Toxoplasma gondii*, via seminal.

Na Tabela 11 (Anexos) está sintetizada a análise estatística dos parâmetros clínicos obtidos. Observa-se que não ocorreu diferença estatística ($P > 0,05$), entre os dois grupos experimentais ao longo de todo estudo.

Figura 6. Temperaturas médias retais mensuradas em fêmeas bovinas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), via inseminação artificial em tempo fixo (IATF). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

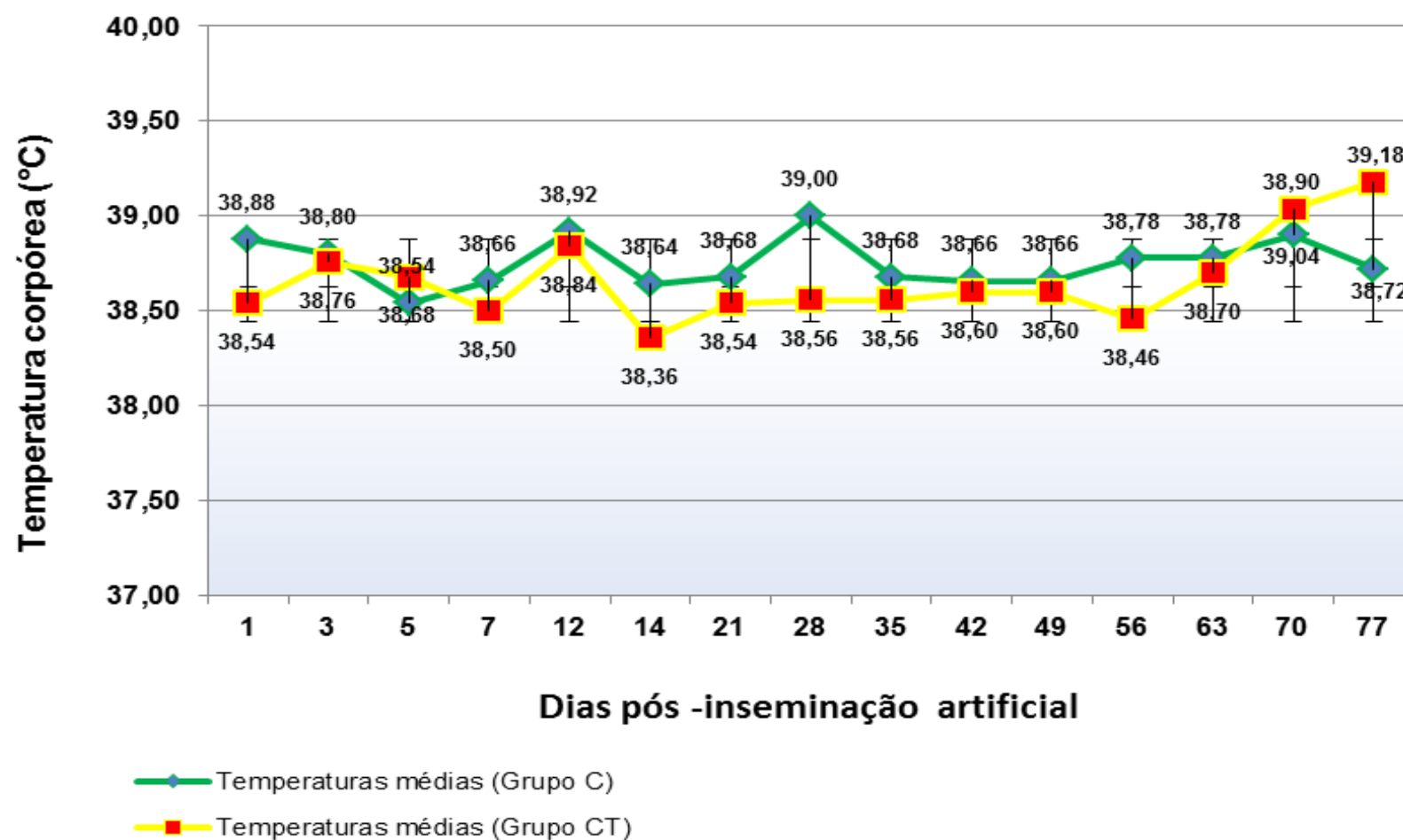


Figura 7. Frequências cardíacas médias (bpm) mensuradas em fêmeas bovinas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), via inseminação artificial em tempo fixo (IATF). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

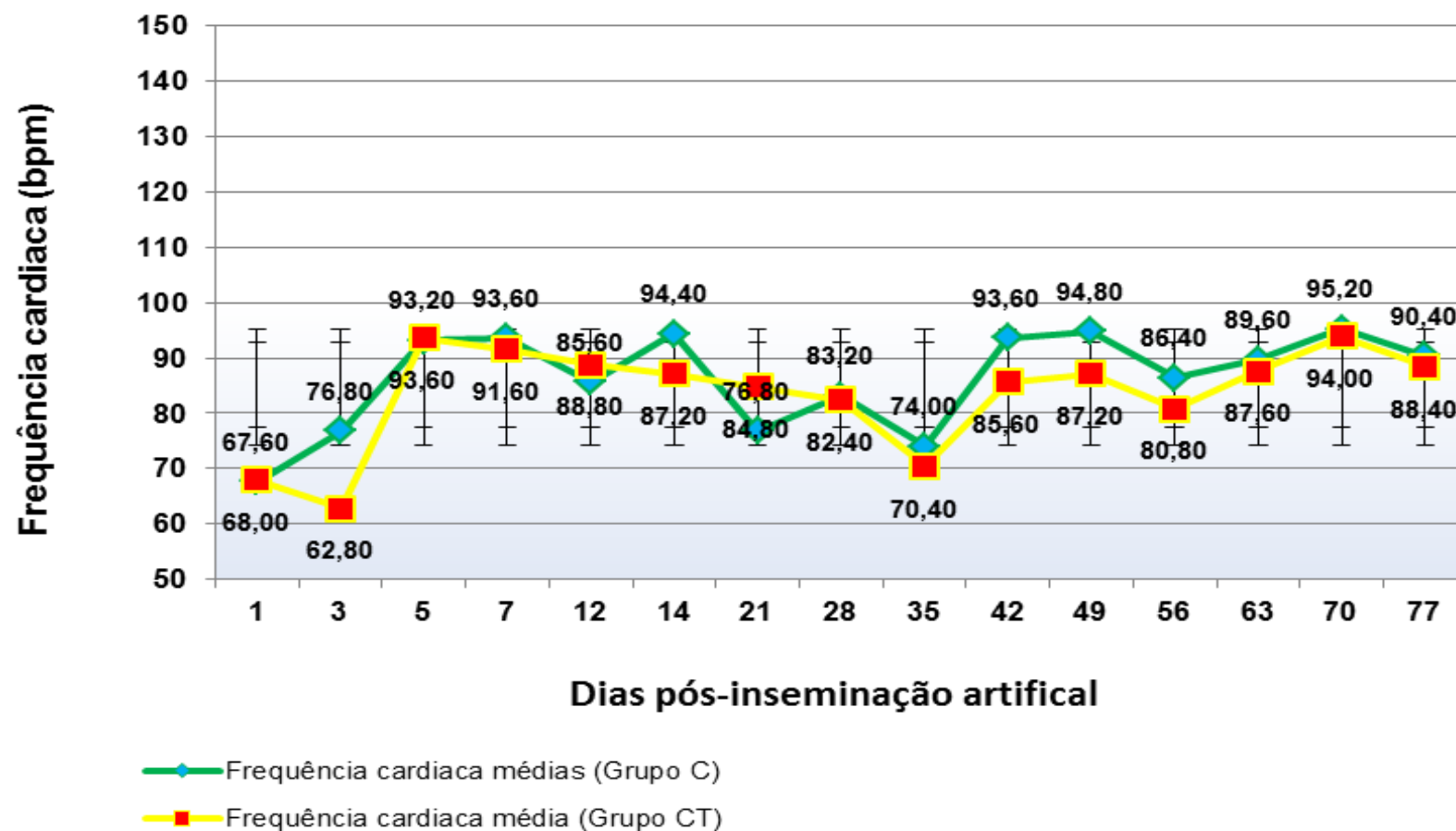


Figura 8. Frequências respiratórias médias (mpm) mensuradas em fêmeas bovinas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), via inseminação artificial em tempo fixo (IATF). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

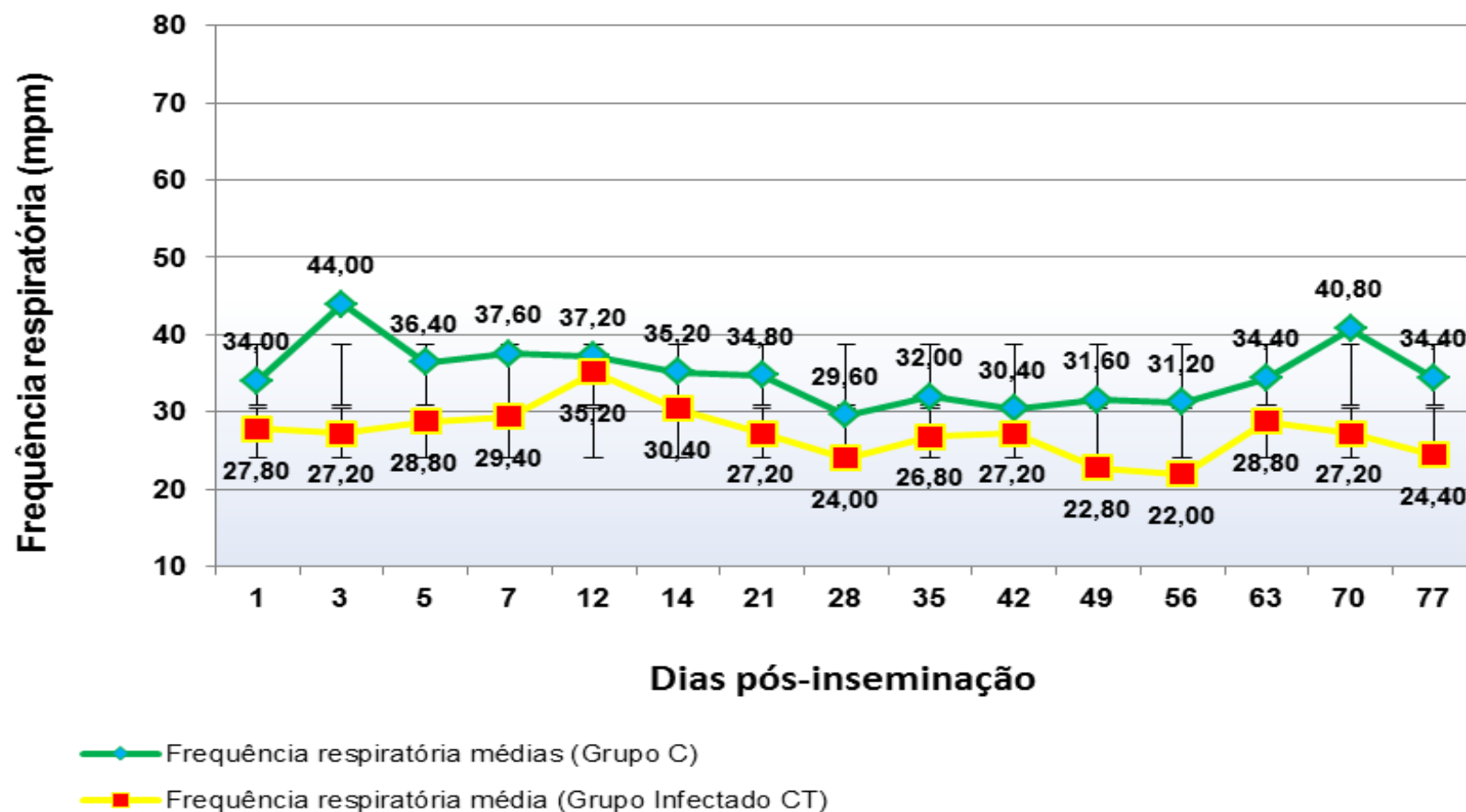
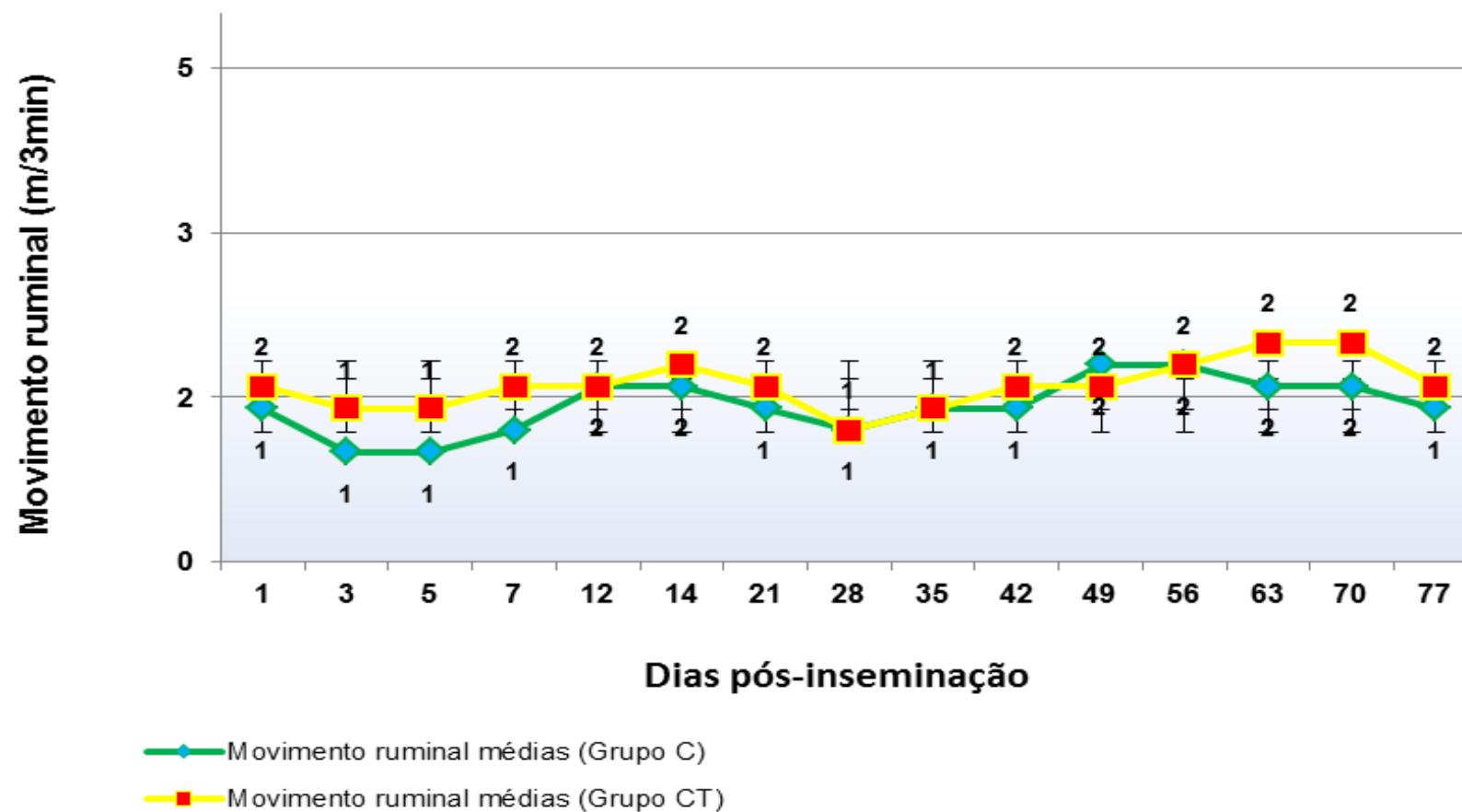


Figura 9. Movimentos ruminais mensurados em fêmeas bovinas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), via inseminação artificial em tempo fixo (IATF). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.



As amostras de sangue das fêmeas bovinas foram encaminhadas ao laboratório de Patologia clínica pertencente ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, localizados nos Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal-SP.

Os parâmetros eritrocitários, leucocitários e as comparações múltiplas dos valores obtidos nas avaliações hematológicas das vacas pertencentes aos grupos experimentais controle e infectado com *T. gondii* estão inseridos nas Tabelas 11 a 27 nos anexos.

Após a seleção das vacas negativas, baseando-se na pesquisa de doenças reprodutivas na data pré-experimental (D-1), foram realizados exames hematológicos para a avaliação da higidez destes animais. Nos exames supracitados pode-se observar aumento dos valores de eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$) em um animal do grupo C, leucocitose em oito animais (grupo controle e grupo infectado com *T. gondii*), seguida de neutrofilia e linfocitose em valores absolutos (Tabela 11).

Os hormônios na espécie bovina, muitas vezes sofrem flutuações na secreção, as quais podem ocorrer ocasionalmente (ritmo circadiano) ou em dias. O hormônio corticotropina (CRH) estimula liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) de maneira pulsátil, com um pico dentro do ritmo circadiano que ocorre nas primeiras horas da manhã, geralmente às quatro horas, ocorrendo a seguir uma diminuição do ACTH ao longo do dia. O cortisol acompanha este ciclo (McDONALD’S, 2003; DUKES, 2006).

Linfocitose fisiológica transitória é observada após uma liberação acentuada de adrenalina devido ao estresse físico ou emocional. Um *pool* rapidamente acessível de linfócitos, análogos ao *pool* marginal de neutrófilos, em bovinos, estimado em cerca de seis a dez vezes maior que no sangue circulante, poderia ser facilmente mobilizado em resposta à adrenalina. A exata localização deste *pool* é desconhecida (JAIN, 1993).

Os corticosteróides liberados endogenamente em resposta ao estresse crônico induzem a uma leucocitose típica com neutrofilia (JAIN, 1993).

Nas datas experimentais subsequentes pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF), com sêmen contaminado com taquizoítos de *T. gondii*, foram realizadas

colheitas de amostras de sangue na primeira semana a cada dois dias. Os resultados registrados foram relatados a seguir. No D1 foram observados valores médios normais de hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$) 9,1 e 8,3, no leucograma detectou-se leucocitose, em ambos os grupos, com média ($10^3/\text{mm}^2$) de 14,5 no controle e 13,8 no grupo infectado. No grupo controle, quatro vacas apresentam leucocitose e no grupo infectado três vacas. Também foi possível observar neutrófilia em quatro vacas no grupo C com média de 6,4 ($10^3/\text{mm}^3$) e 5,9 ($10^3/\text{mm}^3$), em todas vacas do grupo infectado diagnosticou-se, ainda, monocitopenia em ambos os grupos e trombocitose no grupo infectado com *T. gondii* (Tabela 9).

No dia experimental D3 todas as células vermelhas apresentavam-se dentro dos parâmetros de normalidade (FELDMAN, 2000). Por outro lado, quatro animais do grupo controle e três do grupo infectado com *T. gondii* apresentaram médias de leucócitos ($10^3/\text{mm}^2$) de 14,5 e 15,1, respectivamente. Em ambos os grupos, ocorreram neutrófilia (7,3 e 6,6 $10^3/\text{mm}^3$) e linfocitose (7,3 e 8,3 $10^3/\text{mm}^3$). Os valores absolutos de monócitos se normalizaram (Tabela 12). A neutrofilia pode ter ocorrido em ambos os grupos devido a toxicidade provocada inicialmente pela aplicação de estrógeno.

As alterações supracitadas dos parâmetros hematológicos observados em duas datas experimentais (D1 e D3) mantiveram-se no 5º DPIA. A linfocitose normalizou-se na maioria das vacas experimentais. Apenas as vacas nº 2130 (GC) e nº 1108 (GCT) apresentaram trombocitose (Tabela 13).

No 7º dia (D7) observou-se nos exames eritrocitários uma policitemia e um aumento do hematócrito, provavelmente devido às altas temperaturas de dezembro, época em que o experimento foi implantado. Todos os animais dos grupos I e II apresentaram, respectivamente, leucocitose (17,7 e 19,2 $10^3/\text{mm}^3$), linfocitose (10,1 e 8,4 $10^3/\text{mm}^3$), trombocitose e foi diagnosticada, ainda, uma neutrofilia acentuada no grupo infectado com *T. gondii*, alcançando média de 10,0 $10^3/\text{mm}^3$ (Tabela 14).

Na segunda semana após a IATF, foram realizadas colheitas de amostras de sangue em duas datas, no 12º e 14º DPIA. No D12, os animais continuaram com policitemia e hematócritos elevados, a leucocitose se tornou mais acentuada no grupo controle com (média de 20,6 $10^3/\text{mm}^2$) e se manteve no grupo infectado com média de 19,7 ($10^3/\text{mm}^2$). A neutrofilia se manteve estável, e a linfocitose aumentou

nos dois grupos. Alguns animais de ambos os grupos apresentavam trombocitose (Tabela 15 e 16).

No 14º DPIA, as fêmeas bovinas apresentavam policitemia e hematócritos elevados, no entanto, a leucocitose apresentou uma redução nas médias dos grupos experimentais, embora a maioria das vacas tivesse elevado número de leucócitos, porém, com médias semelhantes em ambos os grupos. A neutrofilia reduziu nos dois grupos, a linfocitose se manteve estável e as quantificações de plaquetas se normalizaram (Tabela 16).

Após a data experimental D14 as amostras foram colhidas a cada sete dias. No dia experimental D21 os parâmetros hematológicos foram similares ao ultimo dia de colheita (14º DPIA): leucocitose, neutrofilia e linfocitose em regressão, comparativamente às outras datas experimentais avaliadas (Tabela 17).

A partir do 28º dia (D28) ocorreu uma normalização dos parâmetros hematológicos, no que diz respeito ao eritrograma. Vale frisar que os parâmetros leucocitários mostraram uma diminuição dos valores absolutos, A partir da data D35, a maioria das fêmeas bovina apresentaram os valores hematológicos próximo aos parâmetros de normalidade, com exceção dos bovinos nº 3466, nº 39 e nº 2130 do grupo controle e a vaca nº 1108 do grupo infectado com *T. gondii*, que até o 100º DPIA apresentou leucocitose. As vacas que permaneceram com leucocitose a nº 2130 estava com prenhez positiva, a de nº 3466 era de faixa etária mais elevada e a nº 39 uma novilha. No caso da vaca nº 1108, pertencente ao grupo infectado com *T. gondii*, observou-se apresentou uma linfocitose que ocorreu devido a uma neutrofilia, que não se normalizou.

Tabela 6. Resultados das comparações múltiplas dos valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH). CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal/SP, Brasil. (Continua...)

Parâmetros Hematológicos	Dias pós-inseminação artificial	Grupos Experimentais / Médias e Desvios-Padrão ¹			
		GC: Controle		GCT: Infectado <i>Toxoplasma gondii</i>	
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)*	-1	9,31 ±	1,92 Aabc	8,40 ±	0,78 Ab
	1	9,07 ±	1,65 Abcd	8,30 ±	0,83 Abc
	3	8,44 ±	1,55 Acdef	7,92 ±	0,93 Abcde
	5	8,99 ±	1,76 Abcde	8,17 ±	0,98 Abc
	7	10,91 ±	2,68 Aa	10,61 ±	1,18 Aa
	12	11,05 ±	2,27 Aa	10,27 ±	0,85 Aa
	14	10,51 ±	2,01 Aab	10,63 ±	0,54 Aa
	21	11,04 ±	2,07 Aa	11,07 ±	1,16 Aa
	28	7,95 ±	1,48 Acdef	7,96 ±	1,02 Abcd
	35	7,13 ±	0,27 Aef	6,30 ±	1,26 Ag
	42	7,58 ±	0,40 Acdef	7,40 ±	0,55 Acdef
	49	6,86 ±	0,46 Af	7,58 ±	0,51 Abcde
	56	7,20 ±	0,71 Adef	7,06 ±	0,38 Aefg
	63	7,72 ±	1,13 Acdef	6,72 ±	0,75 Afg
	70	7,32 ±	0,37 Adef	7,44 ±	0,84 Abcdef
	77	7,18 ±	0,35 Aef	7,18 ±	0,43 Adefg
	100	7,12 ±	0,28 Af	7,32 ±	0,36 Adef
Hemoglobina (g/dl)*	-1	11,12 ±	0,94 Abcde	9,30 ±	1,60 Bcde
	1	10,84 ±	0,59 Abcde	9,32 ±	1,71 Bbcde
	3	10,14 ±	1,12 Ae	9,02 ±	1,63 Ade
	5	10,95 ±	0,83 Abcde	9,00 ±	1,70 Be
	7	10,50 ±	1,16 Acde	9,58 ±	1,47 Abcde
	12	10,96 ±	1,15 Abcde	9,58 ±	1,33 Abcde
	14	11,02 ±	0,89 Abcde	9,90 ±	1,14 Aabcde
	21	11,08 ±	0,89 Abcde	10,22 ±	1,71 Aabcde
	28	11,92 ±	1,08 Aab	10,56 ±	1,83 Aabcde
	35	12,88 ±	0,89 Aa	10,61 ±	2,34 Babcde
	42	11,34 ±	0,71 Abcd	11,16 ±	0,97 Aab
	49	10,28 ±	0,76 Ade	11,44 ±	0,71 Aa
	56	10,86 ±	0,96 Abcde	10,68 ±	0,44 Aabcde
	63	11,60 ±	1,63 Abc	9,66 ±	1,24 Babcde
	70	10,22 ±	0,52 Ade	10,80 ±	1,33 Aabcd
	77	11,02 ±	0,69 Abcde	10,96 ±	0,78 Aabc
	100	10,50 ±	0,43 Acde	11,18 ±	0,68 Aa
Hematócrito (%)*	-1	42,72 ±	3,51 Aa	36,08 ±	6,05 Ba
	1	42,30 ±	5,49 Aa	33,45 ±	5,07 Ba
	3	38,26 ±	3,47 Aa	33,40 ±	5,64 Aa
	5	42,25 ±	3,33 Aa	34,78 ±	6,00 Ba
	7	50,34 ±	6,33 Aa	45,10 ±	7,16 Aa
	12	50,92 ±	6,17 Aa	44,04 ±	6,80 Ba
	14	48,84 ±	5,34 Aa	46,42 ±	5,45 Aa
	21	51,82 ±	4,49 Aa	48,04 ±	9,10 Aa
	28	36,96 ±	3,67 Aa	34,08 ±	6,88 Aa
	35	38,64 ±	2,68 Aa	31,84 ±	7,03 Ba
	42	33,80 ±	1,79 Aa	33,20 ±	2,77 Aa
	49	30,80 ±	2,28 Aa	34,20 ±	2,17 Aa
	56	32,40 ±	2,97 Aa	31,80 ±	1,30 Aa
	63	34,80 ±	4,87 Aa	28,80 ±	3,56 Ba
	70	30,60 ±	1,82 Aa	32,40 ±	3,78 Aa
	77	32,60 ±	1,67 Aa	32,60 ±	1,95 Aa
	100	31,60 ±	1,52 Aa	33,40 ±	1,82 Aa
VCM (fm ³)*	-1	47,00 ±	7,04 Aa	42,60 ±	4,39 Aa
	1	46,00 ±	7,00 Aa	42,40 ±	4,39 Aa
	3	46,20 ±	6,22 Aa	42,00 ±	4,69 Aa
	5	48,25 ±	6,80 Aa	42,40 ±	4,56 Ba
	7	46,20 ±	6,38 Aa	42,40 ±	4,39 Aa
	12	47,00 ±	6,52 Aa	42,60 ±	5,03 Aa
	14	45,20 ±	8,29 Aa	43,00 ±	4,85 Aa
	21	47,60 ±	6,02 Aa	43,20 ±	4,92 Aa
	28	47,40 ±	6,02 Aa	42,60 ±	5,03 Aa
	35	47,76 ±	5,96 Aa	42,60 ±	5,03 Aa
	42	44,60 ±	0,55 Aa	44,80 ±	0,84 Aa
	49	44,60 ±	0,55 Aa	45,20 ±	0,84 Aa
	56	44,80 ±	1,10 Aa	45,00 ±	1,00 Aa
	63	45,20 ±	0,45 Aa	43,00 ±	4,00 Aa
	70	41,80 ±	3,27 Aa	43,40 ±	0,55 Aa
	77	45,40 ±	0,55 Aa	45,20 ±	0,45 Aa
	100	44,40 ±	1,52 Aa	45,60 ±	0,55 Aa

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t* ou Kruskal-Wallis** (p≥0,05)

Tabela 6. Resultados das comparações múltiplas dos valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH). CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal/SP, Brasil. (Continua...)

Parâmetros Hematológicos	Dias pós-inseminação artificial	Grupos Experimentais / Médias e Desvios-Padrão ¹			
		GC: Controle		GCT: Infectado <i>Toxoplasma gondii</i>	
HCM (pg)*	-1	12,20 ±	1,94 Abc	11,04 ±	1,19 Ad
	1	12,58 ±	1,90 Abc	11,22 ±	1,22 Ad
	3	12,22 ±	1,73 Abc	11,38 ±	1,41 Ad
	5	12,38 ±	1,65 Abc	11,00 ±	1,24 Ad
	7	9,94 ±	1,58 Ad	9,02 ±	0,82 Ae
	12	10,12 ±	1,48 Ad	9,30 ±	0,94 Ae
	14	10,40 ±	1,76 Acd	9,30 ±	0,99 Be
	21	10,20 ±	1,27 Ad	9,20 ±	0,78 Ae
	28	15,10 ±	2,33 Aa	13,28 ±	1,51 Bbc
	35	15,10 ±	2,33 Ba	13,08 ±	1,81 Bc
	42	15,00 ±	0,00 Aa	15,00 ±	0,00 Aa
	49	15,00 ±	0,00 Aa	15,00 ±	0,00 Aa
	56	14,80 ±	0,45 Aa	15,40 ±	0,55 Aa
	63	15,00 ±	0,00 Aa	14,40 ±	1,34 Aab
	70	13,80 ±	1,10 Aab	14,60 ±	0,55 Aa
	77	15,20 ±	0,45 Aa	15,00 ±	0,00 Aa
	100	14,80 ±	0,45 Aa	15,40 ±	0,55 Aa
CHCM (g/dl)**	-1	25,96 ±	0,66 Ab	25,74 ±	0,47 Ad
	1	26,60 ±	0,55 Ab	26,46 ±	0,81 Ad
	3	26,46 ±	0,69 Ab	26,92 ±	0,59 Ad
	5	25,88 ±	0,30 Ad	25,86 ±	0,70 Ad
	7	21,28 ±	1,35 Ab	21,26 ±	0,62 Ae
	12	21,58 ±	0,44 Ad	21,76 ±	0,53 Ae
	14	23,28 ±	4,71 Ac	21,34 ±	0,56 Be
	21	21,36 ±	0,32 Ad	21,38 ±	0,83 Ae
	28	32,22 ±	0,62 Aa	31,28 ±	2,97 Abc
	35	32,22 ±	0,62 Ba	30,66 ±	5,09 Ac
	42	33,80 ±	0,84 Aa	33,60 ±	0,55 Aa
	49	33,40 ±	0,55 Aa	33,20 ±	0,45 Aab
	56	33,60 ±	0,55 Aa	33,40 ±	0,55 Aa
	63	33,40 ±	0,55 Aa	33,80 ±	0,45 Aa
	70	33,40 ±	0,55 Aa	33,20 ±	0,45 Aab
	77	33,80 ±	1,30 Aa	34,00 ±	1,00 Aa
	100	33,40 ±	0,55 Aa	33,40 ±	0,55 Aa
Leucócitos (10 ³ /mm ³)*	-1	16,22 ±	5,04 Aa	13,12 ±	2,74 Acd
	1	14,50 ±	3,32 Aa	13,76 ±	2,63 Acd
	3	14,54 ±	4,09 Aa	15,10 ±	3,56 Aabcd
	5	12,98 ±	2,96 Aa	14,74 ±	2,84 Abcd
	7	17,72 ±	4,76 Aa	19,24 ±	6,15 Aab
	12	20,56 ±	6,93 Aa	19,68 ±	6,76 Aa
	14	16,54 ±	5,31 Aa	16,28 ±	2,72 Aabc
	21	18,38 ±	6,02 Aa	17,18 ±	2,59 Aabc
	28	15,02 ±	5,01 Aa	12,82 ±	2,35 Acd
	35	16,68 ±	6,58 Aa	11,24 ±	3,65 Ad
	42	16,28 ±	6,27 Aa	11,06 ±	4,08 Ad
	49	15,38 ±	5,90 Aa	11,14 ±	3,75 Ad
	56	15,10 ±	4,81 Aa	11,24 ±	4,10 Ad
	63	15,24 ±	5,14 Aa	11,12 ±	3,56 Ad
	70	15,70 ±	4,52 Aa	11,04 ±	3,29 Ad
	77	15,22 ±	6,73 Aa	11,04 ±	3,72 Ad
	100	15,36 ±	5,50 Aa	11,38 ±	3,81 Ad
Bastonetes (%)**	-1	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	1	0,20 ±	0,45 Aa	0,20 ±	0,45 Aa
	3	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	5	0,25 ±	0,50 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	7	0,20 ±	0,45 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	12	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	14	0,20 ±	0,45 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	21	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	28	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	35	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	42	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	49	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	56	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	63	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	70	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	77	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	100	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t* ou Kruskal-Wallis** (p≥0,05)

Tabela 6. Resultados das comparações múltiplas dos valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH). CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal/SP, Brasil. (Continua...)

Parâmetros Hematológicos	Dias pós-inseminação artificial	Grupos Experimentais / Médias e Desvios-Padrão ¹			
		GC: Controle		GCT: Infectado <i>Toxoplasma gondii</i>	
Bastonetes 10 ³ /mm ^{3**}	-1	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	1	0,02 ±	0,04 Aa	0,02 ±	0,04 Aa
	3	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	5	0,03 ±	0,06 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	7	0,02 ±	0,05 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	12	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	14	0,02 ±	0,04 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	21	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	28	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	35	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	42	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	49	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	56	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	63	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	70	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	77	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	100	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
Segmentados (%)*	-1	41,00 ±	12,94 Aa	39,60 ±	8,85 A
	1	45,00 ±	14,02 Aa	43,80 ±	9,04 A
	3	47,60 ±	15,65 Aa	43,60 ±	8,88 A
	5	38,25 ±	6,60 Ba	51,80 ±	13,63 A
	7	37,60 ±	19,22 Ba	52,20 ±	11,28 A
	12	36,20 ±	7,01 Aa	43,40 ±	16,29 A
	14	34,60 ±	3,97 Aa	37,80 ±	10,23 A
	21	31,60 ±	2,70 Aa	37,20 ±	6,94 A
	28	35,80 ±	12,11 Aa	41,80 ±	4,55 A
	35	38,20 ±	9,34 Aa	49,60 ±	11,50 A
	42	42,42 ±	7,49 Aa	34,00 ±	8,03 A
	49	41,80 ±	8,44 Aa	30,00 ±	8,09 A
	56	38,20 ±	9,18 Aa	32,60 ±	7,77 A
	63	38,60 ±	9,04 Aa	32,20 ±	5,76 A
	70	39,00 ±	8,09 Aa	36,20 ±	5,17 A
	77	37,80 ±	7,26 Aa	38,60 ±	3,29 A
	100	41,20 ±	6,26 Aa	35,60 ±	9,29 A
Segmentados 10 ³ /mm ^{3**}	-1	6,21 ±	0,98 Aa	5,10 ±	1,05 Acdef
	1	6,36 ±	2,70 Aa	5,87 ±	0,93 Abcdef
	3	7,26 ±	3,88 Aa	6,59 ±	2,08 Abcd
	5	5,06 ±	1,73 Aa	7,46 ±	1,81 Aabc
	7	7,12 ±	5,11 Aa	9,96 ±	4,02 Aa
	12	7,67 ±	3,43 Aa	8,05 ±	2,54 Aab
	14	5,68 ±	1,74 Aa	6,15 ±	1,96 Abcdef
	21	5,72 ±	1,66 Aa	6,34 ±	1,29 Abcde
	28	5,40 ±	2,72 Aa	5,10 ±	0,66 Acdef
	35	11,66 ±	9,22 Aa	5,51 ±	2,13 Bbcdef
	42	7,25 ±	3,67 Aa	3,99 ±	2,52 Adef
	49	6,78 ±	3,49 Aa	3,56 ±	2,37 Af
	56	6,11 ±	3,06 Aa	3,85 ±	2,45 Aef
	63	6,19 ±	3,08 Aa	3,70 ±	1,90 Aef
	70	6,40 ±	2,89 Aa	3,85 ±	1,88 Aef
	77	5,58 ±	3,42 Aa	4,32 ±	1,81 Adef
	100	6,58 ±	3,10 Aa	4,22 ±	2,50 Adef
Eosinófilos (%)**	-1	0,80 ±	1,10 Aa	2,00 ±	2,35 Acde
	1	0,60 ±	1,34 Aa	2,00 ±	3,39 Acde
	3	1,40 ±	1,67 Aa	0,80 ±	0,84 Ae
	5	0,00 ±	0,00 Aa	1,80 ±	1,30 Acde
	7	1,20 ±	1,79 Aa	1,60 ±	2,07 Acde
	12	1,20 ±	2,68 Aa	0,60 ±	0,89 Ae
	14	1,60 ±	2,51 Aa	0,80 ±	1,10 Ae
	21	1,20 ±	2,68 Aa	2,00 ±	3,08 Acde
	28	0,60 ±	0,89 Aa	1,00 ±	1,00 Ade
	35	0,60 ±	0,89 Aa	1,20 ±	2,17 Ade
	42	1,12 ±	1,75 Aa	2,40 ±	3,29 Aabcde
	49	1,80 ±	2,68 Ba	4,80 ±	2,77 Aab
	56	2,20 ±	2,49 Ba	5,00 ±	2,92 Aa
	63	2,20 ±	2,05 Aa	3,60 ±	2,19 Aabcd
	70	2,00 ±	2,12 Aa	4,00 ±	2,00 Aabc
	77	2,60 ±	1,67 Aa	4,00 ±	1,58 Aabc
	100	1,40 ±	1,95 Aa	2,20 ±	1,48 Abcde

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t* ou Kruskal-Wallis** (p≥0,05)

Tabela 6. Resultados das comparações múltiplas dos valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH). CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal/SP, Brasil. (Continua...)

Parâmetros Hematológicos	Dias pós-inseminação artificial	Grupos Experimentais / Médias e Desvios-Padrão ¹			
		GC: Controle		GCT: Infectado <i>Toxoplasma gondii</i>	
Eosinófilos 10 ³ /mm ³ **	-1	0,31 ±	0,51 Aa	0,22 ±	0,26 Aa
	1	0,06 ±	0,13 Aa	0,32 ±	0,60 Aa
	3	0,18 ±	0,19 Aa	0,12 ±	0,15 Aa
	5	0,00 ±	0,00 Aa	0,25 ±	0,18 Aa
	7	0,24 ±	0,40 Aa	0,37 ±	0,40 Aa
	12	0,27 ±	0,60 Aa	0,11 ±	0,17 Aa
	14	0,26 ±	0,35 Aa	0,13 ±	0,17 Aa
	21	0,30 ±	0,67 Aa	0,11 ±	0,19 Aa
	28	0,10 ±	0,16 Aa	0,11 ±	0,12 Aa
	35	0,08 ±	0,11 Aa	0,12 ±	0,23 Aa
	42	0,13 ±	0,18 Aa	0,22 ±	0,30 Aa
	49	0,15 ±	0,23 Aa	0,44 ±	0,26 Aa
	56	0,25 ±	0,25 Aa	0,47 ±	0,27 Aa
	63	0,27 ±	0,26 Aa	0,34 ±	0,19 Aa
	70	0,25 ±	0,25 Aa	0,41 ±	0,17 Aa
	77	0,30 ±	0,38 Aa	0,40 ±	0,08 Aa
	100	0,13 ±	0,18 Aa	0,25 ±	0,16 Aa
Basófilos (%)**	-1	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	1	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	3	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	5	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	7	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	12	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	14	0,00 ±	0,00 Aa	0,20 ±	0,45 Aa
	21	0,40 ±	0,55 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	28	0,00 ±	0,00 Aa	0,40 ±	0,55 Aa
	35	0,20 ±	0,45 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	42	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	49	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	56	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	63	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	70	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	77	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	100	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
Basófilos 10 ³ /mm ³ *	-1	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	1	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	3	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	5	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	7	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	12	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	14	0,00 ±	0,00 Aa	0,03 ±	0,06 Aa
	21	0,05 ±	0,07 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	28	0,00 ±	0,00 Aa	0,04 ±	0,05 Aa
	35	0,05 ±	0,10 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	42	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	49	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	56	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	63	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	70	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	77	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
	100	0,00 ±	0,00 Aa	0,00 ±	0,00 Aa
Linfócitos (%)*	-1	55,00 ±	14,04 Aa	56,00 ±	10,84 Aab
	1	52,20 ±	12,26 Aa	52,40 ±	5,41 Aabcd
	3	49,40 ±	15,77 Aa	54,80 ±	7,76 Aabc
	5	59,75 ±	7,14 Aa	43,60 ±	13,13 Acd
	7	59,40 ±	19,58 Aa	43,00 ±	13,15 Ad
	12	61,20 ±	9,52 Aa	52,80 ±	16,21 Aabcd
	14	62,20 ±	5,63 Aa	57,00 ±	10,42 Aab
	21	63,60 ±	4,39 Aa	58,40 ±	7,54 Aab
	28	61,20 ±	11,69 Aa	56,60 ±	3,58 Aab
	35	59,40 ±	8,29 Aa	48,20 ±	11,56 Abcd
	42	54,46 ±	5,96 Aa	60,20 ±	5,17 Aa
	49	55,20 ±	7,19 Aa	62,20 ±	5,54 Aa
	56	57,00 ±	6,89 Aa	59,80 ±	5,76 Aa
	63	56,60 ±	7,09 Aa	61,00 ±	4,18 Aa
	70	56,80 ±	5,81 Aa	58,60 ±	5,27 Aab
	77	57,60 ±	4,72 Aa	53,80 ±	2,77 Aabcd
	100	54,60 ±	3,44 Aa	59,60 ±	8,38 Aa

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t* ou Kruskal-Wallis** (p≥0,05)

Tabela 6. Resultados das comparações múltiplas dos valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e infectado com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH). CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal/SP, Brasil. (Continua...)

Parâmetros Hematológicos	Dias pós-inseminação artificial	Grupos Experimentais / Médias e Desvios-Padrão ¹			
		GC: Controle		GCT: Infectado <i>Toxoplasma gondii</i>	
Linfócitos 10 ³ /mm ³ *	-1	9,38 ±	4,81 Aa	7,50 ±	2,79 Abcd
	1	7,25 ±	1,68 Aa	7,29 ±	2,10 Abcd
	3	7,04 ±	1,88 Aa	8,26 ±	2,21 Aabc
	5	7,68 ±	1,66 Aa	6,56 ±	2,90 Acd
	7	10,07 ±	3,45 Aa	8,42 ±	3,72 Aabc
	12	12,37 ±	4,12 Aa	10,86 ±	6,35 Aa
	14	10,79 ±	4,04 Aa	9,34 ±	2,28 Aabc
	21	11,76 ±	4,03 Aa	10,03 ±	1,97 Aab
	28	9,13 ±	3,76 Aa	6,97 ±	1,28 Abcd
	35	9,57 ±	3,01 Aa	5,50 ±	2,12 Bd
	42	8,63 ±	2,87 Aa	6,52 ±	1,73 Acd
	49	8,24 ±	2,78 Aa	6,79 ±	1,64 Abcd
	56	8,38 ±	2,10 Aa	6,62 ±	1,95 Acd
	63	8,38 ±	2,19 Aa	6,72 ±	1,87 Acd
	70	7,36 ±	4,24 Aa	6,45 ±	1,62 Ad
	77	8,17 ±	3,45 Aa	5,92 ±	1,96 Ad
	100	8,26 ±	2,73 Aa	6,60 ±	1,38 Acd
Monócitos (%)**	-1	2,60 ±	3,71 Aa	2,40 ±	1,82 Aabc
	1	3,80 ±	4,15 Aa	1,60 ±	2,07 Abcd
	3	1,60 ±	1,14 Aa	0,80 ±	0,84 Acd
	5	1,75 ±	1,26 Aa	2,80 ±	3,11 Aabc
	7	1,60 ±	2,07 Aa	3,20 ±	0,84 Aab
	12	1,60 ±	0,89 Aa	3,20 ±	3,03 Aab
	14	1,40 ±	1,34 Ba	4,20 ±	1,79 Aa
	21	3,60 ±	1,67 Aa	2,40 ±	2,30 Aabc
	28	2,40 ±	1,52 Aa	0,20 ±	0,45 Ad
	35	1,60 ±	2,07 Aa	1,00 ±	1,22 Bcd
	42	1,38 ±	1,49 Aa	3,40 ±	1,14 Aab
	49	1,40 ±	1,34 Aa	2,40 ±	0,55 Aabc
	56	2,60 ±	1,82 Aa	2,40 ±	0,55 Aabc
	63	2,60 ±	0,89 Aa	3,20 ±	1,30 Aab
	70	1,51 ±	1,21 Aa	3,20 ±	0,45 Aab
	77	2,80 ±	1,92 Aa	3,60 ±	0,89 Aab
	100	2,80 ±	1,64 Aa	2,60 ±	0,55 Aabc
Monócitos 10 ³ /mm ³ **	-1	0,31 ±	0,43 Aa	0,30 ±	0,23 Ab
	1	0,56 ±	0,62 Aa	0,25 ±	0,33 Ab
	3	0,26 ±	0,21 Aa	0,12 ±	0,14 Ab
	5	0,22 ±	0,18 Aa	0,45 ±	0,55 Ab
	7	0,27 ±	0,31 Aa	0,49 ±	0,20 Ab
	12	0,26 ±	0,18 Aa	0,66 ±	0,61 Ab
	14	0,23 ±	0,23 Aa	0,66 ±	0,32 Ab
	21	0,55 ±	0,24 Ba	10,51 ±	22,64 Aa
	28	0,39 ±	0,37 Aa	0,03 ±	0,06 Ab
	35	0,21 ±	0,25 Aa	0,10 ±	0,10 Ab
	42	0,80 ±	1,27 Aa	0,33 ±	0,07 Ab
	49	0,23 ±	0,25 Aa	0,25 ±	0,05 Ab
	56	0,34 ±	0,21 Aa	0,30 ±	0,17 Ab
	63	0,36 ±	0,04 Aa	0,34 ±	0,13 Ab
	70	0,26 ±	0,16 Aa	0,35 ±	0,09 Ab
	77	0,37 ±	0,26 Aa	0,38 ±	0,08 Ab
	100	0,40 ±	0,24 Aa	0,32 ±	0,13 Ab
Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)*	-1	382,60 ±	206,81 Aa	411,00 ±	122,90 Aa
	1	401,80 ±	148,52 Aa	595,80 ±	240,20 Aa
	3	497,20 ±	261,44 Aa	570,00 ±	200,74 Aa
	5	416,25 ±	149,91 Aa	582,00 ±	249,87 Aa
	7	487,20 ±	144,00 Aa	562,60 ±	216,27 Aa
	12	389,00 ±	304,06 Aa	440,60 ±	200,49 Aa
	14	391,80 ±	158,03 Aa	545,00 ±	124,30 Aa
	21	371,60 ±	168,03 Aa	421,00 ±	216,85 Aa
	28	438,20 ±	338,35 Aa	374,60 ±	113,19 Aa
	35	418,20 ±	219,26 Aa	395,60 ±	66,73 Aa
	42	370,80 ±	176,05 Aa	356,40 ±	78,07 Aa
	49	357,40 ±	138,39 Aa	351,60 ±	37,75 Aa
	56	373,20 ±	36,84 Aa	329,40 ±	40,21 Aa
	63	352,40 ±	65,63 Aa	335,60 ±	46,76 Aa
	70	382,00 ±	23,48 Aa	423,80 ±	30,88 Aa
	77	401,00 ±	67,83 Aa	374,40 ±	98,51 Aa
	100	397,20 ±	71,64 Aa	389,60 ±	97,86 Aa

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t* ou Kruskal-Wallis** (p ≥ 0,05)

Os resultados referentes à resposta imune humoral das vacas, após exames sorológicos (RIFI), nas diferentes datas experimentais, estão expressos na Tabela 7.

Nas datas experimentais 1, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 28, 35, 42, 50, 56, 63, 70, 77 e 100 dias pós-inoculação (IATF), exames sorológicos (RIFI) foram realizados, sendo possível inferir que no 21º DPIA, a soroconversão ocorreu apenas de uma fêmea bovina, pertencente ao grupo infectado com taquizoítos de *T. gondii*, via sêmen. Decorridos 21, 28 e 35 dias pós- inseminação artificial foi possível diagnosticar títulos de 64 e 256. Do 49º ao 56º DPIA foram registrados títulos de 128, e do 63º ao 100º DPIA ocorreu um decréscimo do título sorológico (64), o que significa infecção crônica da sorologia (títulos IgG anti-*T. gondii* $\geq$ 64). Outras três fêmeas apresentaram títulos sorológicos (64) do D56 até D100, e apenas uma fêmea do grupo submetido à IATF com sêmen contaminado por *T. gondii* não apresentou soroconversão. Nenhum animal pertencente ao grupo controle apresentou anticorpos (IgG) contra *T. gondii* ao longo de todo experimento.

Tabela 7. Recíprocas sorológicas obtidas por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros, colhidas das fêmeas bovinas não infectados e infectados via sêmen com *Toxoplasma gondii* (Amostra RH), nas diferentes datas experimentais. CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.

Nº da Vaca	Grupo	Dias experimentais/ Títulos de IgG obtidos pela RIFI															
		-7	-1	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	100	
39	GC: Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1807		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2007		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2130		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3466		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1008	GCT: Infectados por <i>Toxoplasma gondii</i> via IATF (Amostra RH)	-	-	-	-	-	64	256	256	256	128	128	64	64	64	64	
1108		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	64	64	64	64	
2018		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	64	64	64	64
0813		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3462		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	64	64	64	64

* - = Resultados sorológico negativo para *T.gondii*

Surtos parasitêmicos por *T. gondii* foram avaliados em todas as vacas pertencentes aos grupos controle e inoculadas com taquizoítos via sêmen. Nenhum camundongo veio à óbito no período de 42 dias pós-inoculação da camada leucocitária, via intraperitoneal. Os mesmos foram eutanasiados e realizado a colheita do sangue para determinação da resposta imune humoral das seguintes datas experimentais (1, 3, 7, 12, 14, 21, 28, 35, 42, 50, 56, 63, 70, 77 e 100). Após a avaliação da sorologia, pela RIFI nenhum soro testado apresentou reatividade. Portanto, não foi possível diagnosticar parasitemia por *T. gondii* nas vacas experimentais.

Ultrassonografia foi realizada em duas datas pré-inseminação artificial (-7 e -1), para determinação do status reprodutivo das vacas, como presença de metrites, cistos, presença de corpos lúteos e, possível, prenhez. Pelo resultado, direciona-se o tratamento dessas vacas com dose única de prostaglandina (PgF α 2) caso fosse necessário e até mesmo a exclusão do animal.

No exame ultrassonográfico, realizado 30 dias após a inseminação artificial em tempo fixo, observou-se que três vacas do grupo C (controle) sêmen criopreservado com glicerol 3% estavam gestantes (60%), enquanto que nas vacas do grupo CT (sêmen criopreservado com DMSO 8% contendo 1x10⁶ taquizoítos de *T. gondii*) não foi confirmado gestação.

Os estudos para pesquisa de *T. gondii* em tecidos (bioprova) revelaram que os camundongos que receberam macerados de retina, musculatura esquelética, cérebro, fígado e linfonodos mesentéricos apresentavam anticorpos (IgG) anti- *T. gondii* (Tabela 9).

Os resultados referentes à pesquisa nos tecidos colhidos das vacas de DNA de *T. gondii* estão registrados na Tabela 8 e Figura 10. Por meio desta técnica molecular, foi possível identificar o DNA do *T. gondii* em amostras teciduais das fêmeas bovinas do grupo IT (inseminados com sêmen contaminado com *T. gondii*): vaca nº 2018 (cérebro, retina e musculatura esquelética), vaca nº 0813 (retina e musculatura esquelética) e vaca nº 3462 (musculatura esquelética). Apenas uma vaca (nº 1008) estava negativa para a presença de *T. gondii* em todos os tecidos colhidos (*nested* PCR).

Tabela 8. Presença de *Toxoplasma gondii*, realizada por meio da Bioprova e *nested* PCR, em amostras teciduais colhidas das fêmeas bovinas (GC e GCT). CPPAR/FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.

Nº Vacas	Grupo	Tecidos Selecionados/Bioensaio/nested PCR								
		Cérebro	Retina	Pulmão	Fígado	Baço	Linfonodo Mesentérico	Muscularura	Ovário	Útero
39	GC: Controle	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1807*		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2007*		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2130*		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3466		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Total Bioensaio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total nested PCR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0813	GT: Infectados (Toxoplasma gondii)	Negativo	Positivo ^b	Negativo	Positivo ^a	Negativo	Negativo	Positivo ^b	Negativo	Negativo
1008		Positivo ^a	Positivo ^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo ^a	Negativo	Negativo
1108		Negativo	Positivo ^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo ^b	Negativo	Negativo
2018		Positivo ^b	Positivo ^b	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo ^{ab}	Negativo	Negativo
3462		Negativo	Positivo ^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo ^b	Negativo	Negativo
	Total Bioensaio	1	3	0	1	0	0	2	0	0
	Total nested PCR	1	2	0	0	0	0	4	0	0

NR- Não Realizado

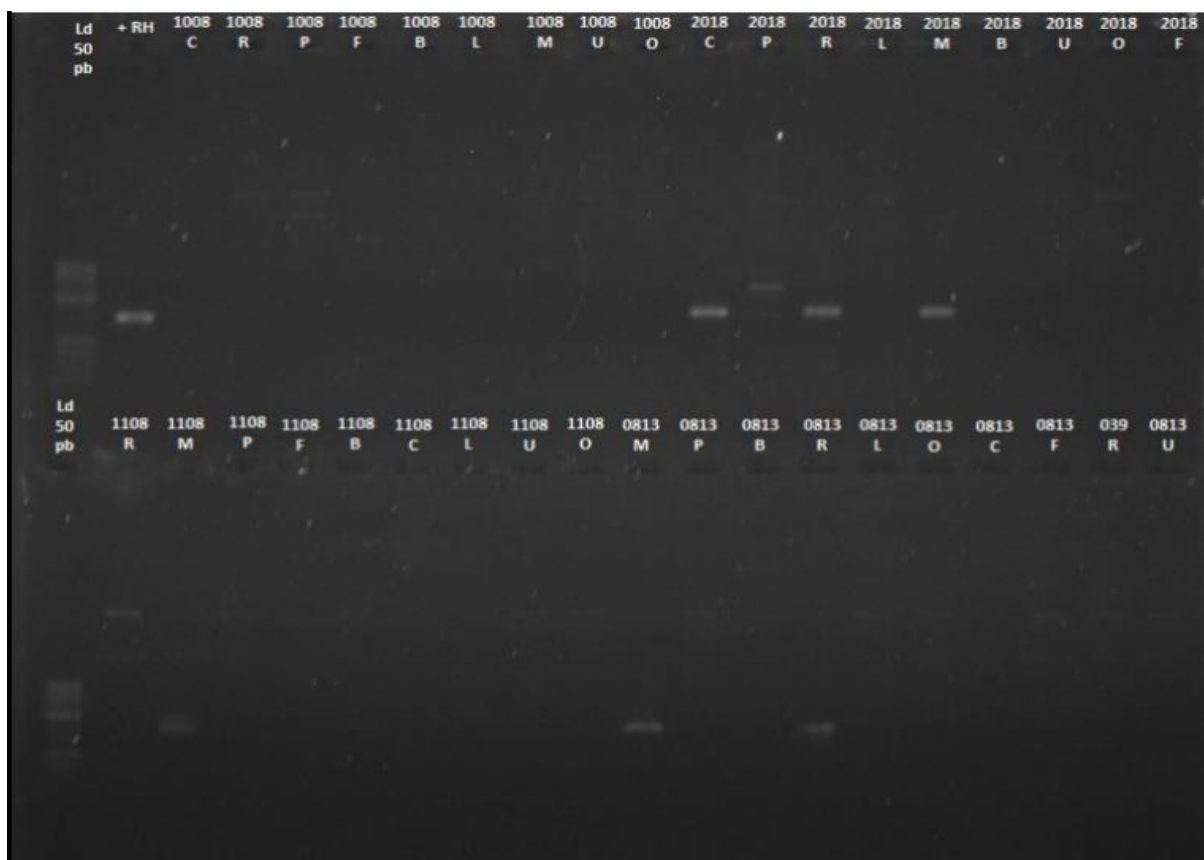
Positivo^a- RIFI ≥1:64 bioensaio dos tecidos inculados em camundongos

Positivo^b- *nested* PCR

Negativo

*- Vacas prenhas

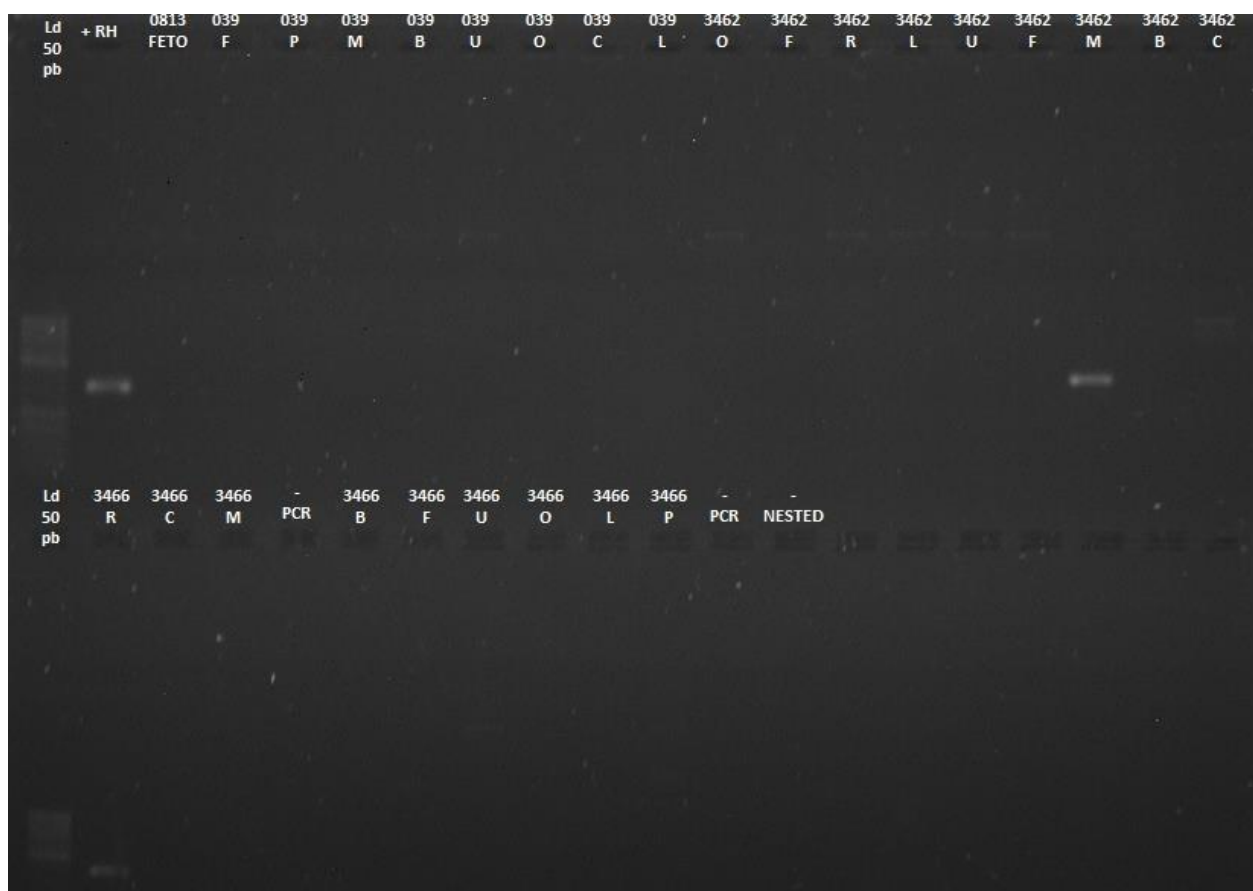
Figura 10. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x, adicionado de 1µL/10mL de Sybr Safe (Life Technologies). A corrida foi realizada inicialmente a 80V por 60 minutos. Após a corrida o produto da amplificação foi visualizado em sistema de foto documentação digital, Sistema Gel-Doc it18, sob luz ultra-violeta e fotografado. (Continua..)



*Legenda órgãos:

- C – Cérebro
- R – Retina
- P – Pulmão
- F – Fígado
- B – Baço
- L – Linfonodo Mesentérico
- M – Musculatura esquelética
- U – Útero
- O – Ovário

Figura 10. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x, adicionado de 1µL/10mL de Sybr Safe (Life Technologies). A corrida foi realizada inicialmente a 80V por 60 minutos. Após a corrida o produto da amplificação foi visualizado em sistema de foto documentação digital, Sistema Gel-Doc it18, sob luz ultra-violeta e fotografado.



*Legenda órgãos:

- C – Cérebro
- R – Retina
- P – Pulmão
- F – Fígado
- B – Baço
- L – Linfonodo Mesentérico
- M – Musculatura esquelética
- U – Útero
- O – Ovário

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, a manutenção da viabilidade e infectividade dos taquizoítos de *T. gondii* foram comprovadas pela bioprova, uma vez que todos os camundongos desenvolveram toxoplasmose aguda, diagnosticada pelos sinais clínicos observados (apatia, pelos arrepiados, abdome abaulado e diarreia). A virulência da amostra RH, sabidamente conhecida, ficou comprovada pela letalidade de 100% dos camundongos, ocorrida dentro de 10 dias após a inoculação.

As amostras isoladas de *T. gondii* são classificadas quanto à sua virulência, tendo como base a inoculação de animais de laboratório, comumente camundongos, com doses conhecidas deste coccídio (WILLIANS et al., 1978). Segundo JOHNSON (1997), uma amostra é classificada como virulenta quando a inoculação de apenas 1×10^2 taquizoítos viáveis são capazes de provocar toxoplasmose aguda nos camundongos, levando-os à morte em período aproximado de sete dias. DARDE et al (1998), contudo, observaram 100% de letalidade em camundongos (linhagem “Swiss”) inoculados com apenas 10 taquizoítos da amostra RH cada. Resultados discrepantes foram encontrados por MITSUKA et al. (1998) que detectaram letalidade apenas com inóculo de 3160 taquizoítos por camundongo, utilizando-se da mesma amostra e mesma linhagem dos animais, com uma média do tempo de sobrevivência de 7,8 dias. Estas diferenças se devem, provavelmente, pelas sucessivas passagens do parasito em uma mesma espécie animal, o que pode alterar a virulência das amostras (JACOBS et al., 1954). No presente estudo não foi possível calcular a dose infectante efetivamente administrada, devido a perda de taquizoítos viáveis no decorrer dos procedimentos experimentais, desde a diluição do sêmen, estresse térmico decorrentes de refrigeração, congelamento e descongelamento. Ainda assim, o comportamento do *T. gondii*, após criopreservação, manteve-se dentro do esperado para uma amostra virulenta do parasito.

Deve-se enfatizar que o parasito manteve-se infectante mesmo no sêmen criopreservado em diluente sem DMSO. Contudo, vale ressaltar que os diluentes utilizados apresentam, em sua composição, frutose, gema de ovo e substâncias com ação crioprotetora, porém, não penetrante nas células (WATSON, 1995).

Em relação ao DMSO, sua ação se deve às lipoproteínas de baixa densidade. Em relação aos espermatozoides, acredita-se que tais substâncias atuem no aumento da pressão osmótica do meio circundante, favorecendo o egresso de água do meio intracelular e, portanto, reduzindo a probabilidade de formação de grandes cristais de gelo intracelular, os quais culminariam com a lise da célula (AMANN & PICKET, 1987; GRAHAM, 1995). O efeito crioprotetor descrito pode ter sido um dos contribuintes para a manutenção da viabilidade dos taquizoítos de *T. gondii* após criopreservação.

LIN et al., (1995) compararam a ação de diferentes temperaturas de armazenamento (-20 °C, -60 °C e -196 °C – nitrogênio líquido) e de dois crioprotetores, glicerol e DMSO, na viabilidade e infectividade do *T. gondii* (amostra RH). Dentre todas, as melhores combinações foram à utilização de DMSO e armazenamento em nitrogênio líquido (após congelamento gradual), o que proporcionou isolamento de taquizoítos viáveis mesmo após oito anos de armazenamento, sendo a virulência do parasito mantida, causando 100% de letalidade nos camundongos entre duas e três semanas.

No presente estudo, todos os camundongos inoculados com taquizoítos apresentaram soroconversão, tanto para IgM quanto para IgG. Este fato, contudo, difere em relação a outros autores, que utilizaram taquizoítos “frescos” da mesma amostra “RH”. CUNHA et al. (2004) inocularam 20 camundongos com dose infectante de 1×10^5 taquizoítos por animal, obtendo 100% de letalidade no 9º DPI (média de sobrevivência igual a 7,7 dias). Todos estes animais apresentaram-se negativos ao exame sorológico (RIFI), utilizando-se do mesmo ponto de corte do presente experimento ($1 \geq 64$). GUIMARÃES (2008) inoculou 18 camundongos com 1×10^2 taquizoítos por animal, obteve 100% de letalidade em média (6º DPI), sendo que nenhum dos animais apresentou anticorpos (classe IgG) à RIFI. Utilizando amostra avirulenta e cistogênica “ME-49”, na mesma dose infectante, GUIMARÃES (2008) e COSTA-SILVA & PEREIRA-CHIOCCOLA, (2010) conseguiram detectar anticorpos da classe IgG, pela RIFI, 10 e 14 dias após a infecção, respectivamente.

A presença do *Toxoplasma gondii* em bovinos no que se refere à eliminação no sêmen de touros foi comprovada por SCARPELLI et al., (2009), bem como a

manutenção da viabilidade dos taquizoítos em amostras seminais criopreservadas, confirmada, também, no presente estudo, ressaltando, assim, a infectividade do parasito para as fêmeas bovinas no procedimento via transvaginal. Em relação a um coccídeo semelhante, *Neospora caninum*, importante por ocasionar de abortamento em vacas, CANADA et al. (2006) inseminaram vacas com sêmen criopreservado e contaminado com taquizoítos do parasito. Entretanto, os animais experimentais não apresentaram soroconversão pelo método de aglutinação direta (MAD), à exceção de uma vaca que apresentou baixos títulos em único dia experimental, provavelmente por simples estímulo antigênico do parasito no trato reprodutor. Contudo, vale ressaltar que os autores em questão contaminaram o sêmen após seu descongelamento. Como os taquizoítos não passaram pelo mesmo estresse térmico dos espermatozoides, resultados e interpretação possivelmente equivocadas podem ter sido obtidos.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi escolhida para avaliação da resposta humoral das vacas no presente estudo, como teste de diagnóstico de infecção toxoplásmica, apresentando resultados significativos de confiabilidade, tanto para a espécie humana como para espécies animais, justamente por ser considerada de fácil exequibilidade e boa sensibilidade (ARAÚJO et al., 1998). BEKNER DA SILVA et al., (1994) verificaram que os antígenos de *T. gondii* parecem ser comuns a diferentes amostras de protozoários e apresentam-se predominantemente na RIFI.

A soroconversão das vacas inseminadas com sêmen criopreservado e contaminados com *T. gondii* experimentalmente, foi diagnosticada por meio de uma resposta tardia, com detecção de anticorpos aos 21º DPIA em uma vaca e a partir do 56º DPIA em outras três vacas. Apenas uma vaca do grupo que recebeu sêmen contaminado não apresentou recíprocas de títulos sorológicos nas diferentes datas experimentais avaliadas (Tabela 24). Estes resultados diferenciando dos demais estudos realizados com amostras seminais experimentais e naturalmente infectadas com *T. gondii*, em ruminantes e monogástricos que comprovaram resposta humoral no 5º DPI e 8º DPI (ARANTES et al., 2009 em cães; MOURA et al., 2007 em suínos; SCARPELLI et al., 2009; COSTA et al., 2011 em bovinos; LOPES et al., 2009 em ovinos; SANTANA et al., 2013). Realizando estudo com monta natural em caprinos

machos positivos para *T. gondii*, inoculados via subcutânea com 1×10^6 taquizoítos e 2×10^6 oocistos e comprovada eliminação via sêmen, Santana et al., (2014) verificaram que os animais apresentaram soroconversão do 14º DPI e 28º DPI. As fêmeas submetidas a monta natural com esses reprodutores apresentaram soroconversão no sexto dia pós-monta pelo ELISA-teste (SANATANA et al., 2014). Está discrepância sorológica, deve-se, principalmente, pelo fato dos animais terem sido infectados artificialmente com oocistos e taquizoítos de *T. gondii*, o que possibilitou a eliminação do parasito. No presente estudo, amostras seminais depois de colhidas foram diretamente contaminadas com *T. gondii*, as durante o processo de criopreservação com adição de estreptomicina para inseminação artificial.

SERRANO-MARTÍNEZ et al., (2006), por sua vez, compararam a resposta de vacas e novilhas frente à inseminação artificial com sêmen contaminado com diferentes quantidades de taquizoítos de *N. caninum* (1×10^2 , 5×10^3 , 5×10^4 e 5×10^5). Em relação às vacas, apenas uma, inseminada com sêmen contendo a maior concentração do parasito, apresentou soroconversão. Em se tratando de novilhas, contudo, com exceção do controle e das inseminadas com sêmen contendo 1×10^2 taquizoítos, nos demais grupos, pelo menos um animal apresentou tanto parasitemia quanto soroconversão no 42º, 56º e 63º pós-inseminação artificial, configurando a inseminação artificial como via de transmissão da neosporose bovina.

A curva de IgG observada neste experimento (Tabela 24) teve início no 21º DPIA em apenas uma vaca experimental (64) alcançando o pico máximo (256) nos dias 21º, 28º e 35º DPI. Posteriormente, ocorreu declínio sorológico nas datas subsequentes até a cronificação (64) a partir do 63º DPIA até 100º DPIA. Outras três vacas experimentais soro converteram a partir do 56º DPIA (64) e mantiveram este índice até o 100º DPIA. Vale ressaltar que a resposta imune humoral (nas cinco fêmeas inseminadas com sêmen contaminado com *T. gondii*) mantiveram-se elevados do 21º ao 56º, decrescendo posteriormente. Estes achados corroboram com os relatados por SHARMA & SHIMIZU (1974), citados por DUBEY (1986) e SCARPELLI et al, (2009). Os autores relataram que anticorpos relacionados à infecção crônica (IgG) apresentam a capacidade de se manterem “ativos” por longo período (de 70º a 100º no presente trabalho), quando comparados com as

imunoglobulinas de classe IgM, identificadas apenas nas primeiras semanas após infecção.

Os valores das recíprocas sorológicas anti-*T. gondii* em bovinos naturalmente infectados, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) do presente estudo, harmonizam com os níveis de prevalência em bovinos nos quais os títulos mais frequentes foram 128 (80,10%) e 256 (73,94%). Cerca de 98% dos bovinos apresentaram titulações menores ou iguais a 1024, o que possibilita inferir a infecção crônica da doença e eventuais presenças de cistos teciduais (MARANA et al., 1995; GARCIA et al., 1999; SANTOS et al., 2009). COSTA et al. (2010) inoculando oocistos em vacas, diagnosticaram frequências de títulos sorológicos que variaram recíprocas de 64, 128, 256 e 1024 do nas diferentes datas experimentais avaliadas 8º e 211º dias pós-inoculação.

LUCIANO et al., (2011), examinando 459 amostras de soro bovino colhidas em frigoríficos no Rio de Janeiro detectaram anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 1,96%, observando o mesmo padrão de títulos sorológica 64 e 256 característico de infecção crônica.

É relevante ressaltar que em algumas datas experimentais, a temperatura retal, frequência cardio/respiratória e movimentos ruminais, em animais ambos grupos, apresentaram algumas alterações, justificadas pelo stress decorrido no momento de contenção dos animais.

Os principais sinais clínicos, observados em bovinos por Costa et al., (1977), no Brasil foram: hipertermia, distúrbios respiratórios, descargas ocular e nasal, hiperemia de conjuntiva e anorexia. Em contraposição ao presente estudo, todos os animais (grupo controle e grupo contaminado com *T. gondii*) apresentaram alterações em seus parâmetros fisiológicos, com variada intensidade, provavelmente em decorrência do manejo das vacas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) e submissão ao protocolo hormonal realizado na inseminação artificial em tempo fixo. Esses valores são confirmados pela estatística ($P>0,05$) realizada, possibilitam que bovinos e bubalinos são resistentes à infecção, pois soroconvertem e dificilmente manifestam sinais clínicos, ou seja, é susceptível a infecção, porém resistente à doença induzida por *T. gondii* (DUBEY, 1986; MEGID, RIBEIRO, PAES, 2016).

OLIVEIRA, COSTA, SABATINI (2001) registraram em bovinos inoculados com 2×10^5 oocistos de *T. gondii* (amostra "P") hipertermia, taquicardia e dispneia, diferentemente do grupo controle. SCARPELLI et al. (2009) também verificou hipertermia em *Bos taurus* e *Bos indicus* após 16 dias pós-inoculação independentemente das amostras "P" e "RH" utilizadas e as formas evolutivas do *T. gondii*. Dubey (1983) e Esteban Redondo et al. (1999) reportaram hipertermia em bovinos infectados experimentalmente com *T. gondii*, do 2º ao 7º e 5º ao 8º dias pós inoculação, respetivamente.

Na infecção experimental de *B. indicus* e *B. taurus* com oocistos de *T. gondii*, observou-se que os taurinos apresentaram sintomatologia mais grave do que os zebuínos (OLIVEIRA; COSTA; SABATINI, 2001). A ausência de parasitemia nas vacas do presente estudo pode estar relacionada ao fato destes animais serem cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com predominância de características das raças zebuínas. Parasitemia foi observada por outros autores.

A via de infecção, fase evolutiva do *T. gondii* utilizada e a quantidade do inoculo parece não ter influenciando significativamente ($P > 0,05$) os resultados dos exames hematológicos entre os dois grupos experimentais, as maiores alterações ocorreram do 1º ao 28º DPI, como leucocitose seguida de neutrofilia. A explicação para esses resultados em ambos os grupos, pode-se justificar pelo manejo diário, pela administração de hormônios inerentes ao protocolo de IATF e pelo fato do horário matinal das colheitas das amostras de sangue, outro fator é que comumente ocorre é a leucocitose fisiológica é comum principalmente, em animais jovens com distúrbios emocionais e físicos (JAIN, 1993; MCDONALD'S, 2003).

A partir do 35º DPIA as vacas de ambos os grupos não apresentaram tais alterações e apenas as três vacas do grupo controle, comprovadamente gestantes, apresentaram leucocitose com linfocitose e neutrofilia. Tais valores, entretanto, foram estabilizando até o final do estudo (100º DPIA). Os valores médios hematológicos estiveram dentro dos parâmetros de normalidade para as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus* estudadas por OLIVEIRA; COSTA; SABATINI, (2001), tendo os zebuínos valores mais brandos de alterações hematológicas que taurinos. Estes autores diagnosticaram, também, leucocitose no 14º, 21º, 35º e 63º DPIA.

DUBEY (1992) isolou *T. gondii* da parede intestinal de uma fêmea bovina adulta. Uma das principais dificuldades na detecção de *T. gondii* em tecidos de bovinos é a limitação do tamanho da amostra examinada. É possível que o parasito possa estar presente em partes de tecidos e um resultado negativo de qualquer amostra não significa necessariamente que todo o tecido esteja livre do parasito (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999). Na inoculação experimental de reprodutores jovens com *T. gondii* foi isolado pelo bioensaio e PCR convencional, no fígado, baço, retina, cérebro, pulmão, gânglios linfáticos, testículos, musculatura esquelética e vesícula seminal (SCARPELLI et al., 2009). Resultados semelhantes em bovinos haviam sido encontrados por SANGER et al., (1953), JACOB et al., (1961), WORK, (1967), CATAR et al., (1969).

No presente estudo, *T. gondii* foi diagnosticado, pelos seguintes tecidos das vacas: retina, musculatura esquelética, cérebro, fígado e linfonodo mesentérico. Pela *nested* PCR, o parasitismo tissular restringiu-se a retina, cérebro e musculatura esquelética. Portanto, pela bioprova diagnosticou-se e apresentou positividade em maior quantidade de órgãos e que a extração pode conter uma baixa quantidade de DNA do parasito. Tal fato pode interferir ou ser insuficiente para visualizar a amplificação de 260/280 bps no gel de eletroforese, amplificadas com solução de azul de bromofenol. A possibilidade do *T. gondii* estar presente nas mesmas não pode ser descartado, já que são necessários 500ng de DNA “genômico”(hospedeiro/parasito) por reação. Os mesmos resultados harmonizam com os dados obtidos das amostras “RH”, “VEG” e “ME-49” de tecidos de predileção para *T. gondii* (cérebro, diafragma, baço, rins, fígado, coração, músculo, útero, ovário e placenta), obtidos em fêmeas de pequenos ruminantes caprinos e ovinos, respectivamente, onde a bioensaio apresentou maior sensibilidade do que a PCR (SILVA et al., 2014 e SANTOS et al., 2016). Alguns autores recomendam que a técnica da PCR possa ser um método vantajoso, quando consorciado a outro meio de diagnóstico (STEUBER et al., 1995; ELLIS, 1998).

HITT & FILICE, (1992) afirmaram que, apesar de apresentar uma praticidade mínima laboratorial, a eficácia do bioensaio no isolamento de *T. gondii* é muito maior em relação à técnica de PCR. Esta conclusão também foi comprovada por

ESTEBAN REDONDO et al., (1999), quanto ao isolamento deste protozoário em ovinos e bovinos.

Deste modo, o diagnóstico por PCR reforça os achados da bioprova e evidencia que esta técnica pode ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da infecção toxoplásmica (BURG et al., 1989).

Novos estudos devem ser realizados para avaliar com que frequência esse método de transmissão ocorra “no campo” e como isso impactaria. De qualquer maneira os resultados obtidos confirmam a transmissão de *T. gondii* por meio da IATF utilizando sêmen criopreservado e contaminado por taquizoítos do protozoário em questão.

8. CONCLUSÕES

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

a-) A presença de agentes crioprotetores no diluente utilizado para criopreservação seminal, não interferiu na manutenção da viabilidade de *T. gondii*, durante, pelo menos, 24 horas de criopreservação.

b-) A infecção toxoplásmica das vacas inseminadas com sêmen contaminado, ficou comprovada pela soroconversão, ou seja, pela produção de anticorpos contra este protozoário (RIFI).

c-) O parasitismo tissular por *Toxoplasma gondii* foi diagnosticado nas vacas inseminadas com sêmen contendo deste coccídeo, por meio do bioensaio e *nested* PCR, o que reforça, ainda mais, a presença de infecção toxoplásmica transmitida pela IATF.

d-) Por tanto, os resultados inéditos obtidos, possibilitam inferir que sêmen criopreservado com DMSO 8%, contendo *T. gondii*, pode transmitir este protozoário a vacas artificialmente inseminadas (IATF), ou seja, a IATF pode constituir um fator de disseminação da toxoplasmose em rebanhos bovinos.

9. REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. D. F.; TEXEIRA, M. F. S.; TELES, C. H. A.; MARTINS, G. R.; JUNIOR, R. Q. B.; COSTA, E. C. C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p.80-93, 2012.

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

AMANN, R. P. & PICKET, B. FORAM. P. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 7. p. 145-173, 1987.

AMATO NETO, V., MEDEIROS, E.A.S., LEVI, G.C., DUARTE, M.I.S. **Toxoplasmose**. 4 ed. São Paulo, Sarvier, p. 154,1995,

AMENDOEIRA, M. R.; CAMILLO-COURA, L. F. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. **Scientia Medica (Porto Alegre)**, v.20, n.1, p.113-119, 2010.

ARAMINI, J. J.; STEPHEN, C.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. **Journal of Parasitology**, New York, v. 84, n. 2, p. 438-440, 1998.

ARAMINI, J. J.; STEPHEN, C.; DUBEY, J. P.; ENGELSTOFT, C.; SCHWANTJE, H.; RIBBLE, C. S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Epidemiology and Infection**, v. 122, n. 2, p. 305-315, 1999.

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

ARAUJO, F.A.P.; SANTOS, J.R.; SOUZA, W.J.S. Detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected pigs by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the area of great Erechim, RS, Brazil. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 26, n. 02, p. 57-65, 1998.

AVMA Guidelines on Euthanasia of Animals: 2013 Edition. 102p., 2013. Disponível em: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>

BARBAS, J.P. & MASCARENHAS, E.R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**. v. 10. p. 49-62, 2009.

BEKNER DA SILVA, A. C.; MITSUKA, R.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; JANKEVICIUS, S. I.; VIDOTTO, O.; JANKEVICIUS, J. V. Avaliação pela imunofluorescência indireta dos aspectos imunogênicos e antigênicos de diferentes amostras de *Toxoplasma gondii* inoculadas em suínos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 03, n.01, p. 17-22, 1994.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p. 607-623, 2000.

BOWERMAN, R.J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in rural India: a preliminary study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p: 622, 1991.

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

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

CALDERAM, I.B.K, MASCHIO, É.F, MADEIRA, E.M, ULGUIM, R.R, RAMBO, G, CORRÊA, É.K, LUCIA, Jr .T. DESCHAMPS ,J.C, CORRÊA, M.N. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v.38, p.1978-1983, 2008.

CALLOW, L.L. & FARRANT. J. Cryopreservation of the promastigote form of *Leishmania tropica* var. major at different cooling rates **International Journal for Parasitology**. v. 3. p. 77–88, 1973.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 117-118, 1964.

CANADA, N.; MEIRELES, C. S.; FERREIRA, P.; DA COSTA, J. M. C.; ROCHA, A. Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Veterinary Parasitology**. Volume 139, Issues 1–3, 30, Pages 109-114, 2006.

CATAR, G.; BERGENDI, L.; HOLKOVA, R. Isolation of *Toxoplasma gondii* from swine and cattle. **Journal of Parasitology**. v. 55. p. 592-97, 1969.

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

CLEMENTINO, M. M.; SOUZA, M. F.; ANDRADE NETO, V. F. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Volume 146, Issues 3-4. pp. 199-203, 2007.

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

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

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

COSTA, A. J.; ARAÚJO, F. G.; COSTA, J. O.; LIMA, J. D.; NASCIMENTO, E. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, New York, v. 63, n. 02, p. 212-218, 1977.

COSTA, A.J. E COSTA, E.P. Frequência de bovinos reagentes à reação de Imunofluorescência Indireta para *Toxoplasma gondii* em Poços de Caldas, MG, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. UFMG, v.30, n.1, p.47-51, 1978.

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

COSTA, A.J., VICENTE, R.T., COSTA,T., KLOBUCARI, A., PAULILLO, A.C. Contribuição ao estudo da toxoplasmose canina. **Biológico**, v.44, p.293-297, 1978b.

COSTA-SILVA, T. A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Fase aguda da infecção por *Toxoplasma gondii*: avaliação do parasitismo sanguíneo e resposta humoral em camundongos isogênicos AS/n. **Scientia Medica (Porto Alegre)**; v. 20, n. 1, p. 88-92, 2010.

CUNHA, A. L. P.; SILVA, R. C.; DA SILVA, A. V.; LANGONI, FORAM. The protective effects of Baypamun®HK in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 41.p. 169-172, 2004.

DAY, J. G. & MCLELLAN, M. R.. Cryopreservation and Freezing-Drying Protocols. New Jersey: Humana Press. 1995

DARDE, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Izoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by electrofocussing in polyacrilamid gels. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.39, p.551-8, 1988.

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

DREESEN, D.W. *Toxoplasma gondii* infections in wildlife, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p.274–276, 1990.

DIRKESEN, G.; GRÜNDER, H.; STÖBER, M. Rosenberger: **Exame clínico dos bovinos**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooogan, p. 419,1993,

DUBEY, J.P. Distribution of cysts an tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocystis. **Veterinary Parasitology**, v, 13;199-211.1983.

DUBEY, J.P., BRAKE, R.J., MURRELL. K.D., FAYER, R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47: 518-522, 1986.

DUBEY, J. P. & TOWLE, A. **Toxoplasmosis in sheep**. St. Albans: Common Wealth. Institute of Parasitology, 1986.

DUBEY, J. P. & LINDSAY D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 67. P. 1-59, 1996

DUBEY, J. P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**. v.13(1). p. 199-201, 1983

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**. v.22, p. 177-202, 1986.

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

DUBEY, J. P. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. **Journal of Parasitology**. v. 78(1). p.151-153,1992.

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

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

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis. In: PALMER, S.R.; SOULSBY, E.J.L.; SIMPSON, D.I.H. Zoonosis. **Oxford Medical publication**, p. 579-597, 1998.

DUBEY, J. P. History of Discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 39, p. 877-882, 2009.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animal and humans**. 2 ed. Boca Raton; CRC Press, 2010.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M., SU, C., JONES, J. L. Review Article. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology, Cambridge**. v. 139, n. 11, 1375–1424, 2012.

DUKES. Fisiologia dos animais domésticos. 11. ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A**, p. 926, 2006.

DUMAS, N. Conservation aux basses températures de *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux, 1909: action du dimeethyl-sulfoxyde. **Ann. Parasitol. Hum. Comp**. v. 49. p. 1-40. 1974.

ELLIS, J. T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 28. P. 1053-60, 1998.

ENVIRONMENTAL GUIDANCE DOCUMENT OF DISPOSAL OF ANIMAL CARCASSES (2010). Disponível em: [http://www.deq.state.ne.us/Publica.nsf/23e5e39594c064ee852564ae004fa010/fd5e7d97e288405d86256ea6005b459e/\\$FILE/06-201.pdf](http://www.deq.state.ne.us/Publica.nsf/23e5e39594c064ee852564ae004fa010/fd5e7d97e288405d86256ea6005b459e/$FILE/06-201.pdf)

ESTEBAN REDONDO, M. S.W.; THOMSON, K.; NICOLI S.; WRIGHT S.; BUXTON D. & INNES E. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary. Parasitology**. v. 86(1). p.155-157, 1999.

FAYER, R., FRENKEL, J.K. Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidian: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma*. **Journal of Parasitology**, v. 65. p. 756-762, 1979.

FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária – a Arte do Diagnóstico**, 3 ed. São Paulo: Roca. 2014.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5ed. Canadá: Lippincot Williams & Wilkins. 2000.

FERGUNSON, D. J. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **International Journal for Parasitology**, v. 34. p. 347-360, 2004.

FERGUNSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1909-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.104, p.133-148, 2009.

FICKEL, J, WAGENER, A, LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53, p.81-89, 2007.

FERNANDES, A. C.; HEROLD, B; MAIA, H; RAUTER, A. M; RODRIGUES, J. A. R; **Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos**. Lisboa: Lidel, p. 220, 2002.

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

FIGUEROA DAMIAN, R. Risk of transmission of infectious diseases by transfusion. **Ginecología y Obstetricia de México**, México, v. 66, p. 277-283, 1998.

FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocyst, **Journal of Parasitology**, v. 59, p. 587-588, 1973.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in human beings. **Journal of the American Veterinary Medical Association**., v. 2, n. 196, p. 240-248, 1990.

FUENTES, S.I.; RODRIGUES, M.; DOMINGO, C.J; FERNANDO, C.C.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for Toxoplasmosis diagnosis by PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v.03, n.10, p. 2368-2372, 1996.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; PEREIRA, A. B. L.; SINHORINI, I. L. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFA and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**. v. 113, n.2, June, 2006, p. 100-105, 2006.

GUIMARÃES, L. R. Perfil sorológico experimental de camundongos infectados com a cepa cistogênica me-49, de *Toxoplasma gondii* antes e pós-terapêutica específica. Goiânia, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública**, UFG, (Dissertação de Mestrado), p. 92, 2008

COSTA, G. H. N.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D. Z.; BRESCIANI, K. D. S.; SANTOS, T. R.; ESPER, C. R.; SANTANA, E. S. *Toxoplasma gondii*: Infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Experimental Parasitology**. v. 127, p. 277-281, 2010.

GRAHAM, J. K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. **Equine Sciences**. p. 83 – 95, 1995.

HALONEN, S.K.; TAYLOR, G.A.; WEISS, L.M. Gamma interferon- induced anhibition of *Toxoplasma gondii* in astrcytes mediated by IGIP. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**,v. 69, n. 9, p. 5573-6, 2001.

HENTRICH, B. & BOSE. R. Cryopreservation of Babesia divergens from jirds as a live vaccine for cattle. **International Journal of Parasitology** v. 23. p. 771-776, 1993.

HILL, D. & DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8. p. 634-640, 2002.

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

HUBÁLEK, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**. v. 46. p. 205-229, 1976.

HITT J. & FILICE G. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification cell culture and mouse-inoculation. **Journal of Clinical Microbiology**. 30(10):3181-3184. 1992.

HO-YEN, D. O.; JOSS A. W.; BALFOU,R A. H.; SMYTH, E. T.; BAIRD, D.; CHATTERTON, J. M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. **Journal of Clinical Pathology**. v. 45, n. 10, p. 910-913, 1992.

HOLLAND, G. N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n.6, p. 973-988, 2003.

ISRAELSKI, D. M. & REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**. 1993, v. 17, n. 2, p. 423-435, 1993.

JOHNSON, L. L. & SAYLES, P. C. Interleukin-12, dendritic cells, and the initiation of hostprotective mechanisms against *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.186. p.1799-1802, 1997.

JACOBS, L.; MELTON, M. L. Modification in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various host. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.3, p.447-57, 1954.

JACOBS, L.. **Toxoplasmosis in man and animals**. New Zeland Veterinary Journal. v. 9, p. 85-91, 1961.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. **Philadelphia:Lea & Febiger**, 1993, 417p.

KASHIWAZAKI, N, OKUDA, Y, SEITA ,Y, HISAMATSU, S, SONOKI, S, SHINO, M, MASAOKA, T, INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **J Reprod Dev**, v.52, p.511-516, 2006.

KASPER , L. H. Infecção por toxoplasma. In: BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L.; editors. **Harrison Medicina Interna**. 15a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. p. 1294-8. 2002.

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

KRAMPS, J. A. et al. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 135-144, 1999.

KHURANA, S.; DUBEY, M. L.; MALLA N. Association of Parasitic Infections and Cancers. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 23, n. 2, p. 74- 79, 2005.

KUNDU, C. N.; DAS, K; MAJUNDER, G. C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, v.41, p.21-27, 2001.

LE CORROLLER, Y., GYSIN, J., AND L'HERETE, P. Vne technique simple de conservation des protozoaires par congelation, **Arch Inst Pasteur Alger journal**, v. 48, p. 109-124. 1970.

LEWDEN, C.; SALMON, D.; MORLAT, P.; BÉVILACQUA, S.; JOUGLA, E.; BONNET, F.; HÉRIPRET, L.; COSTAGLIOLA, D.; MAY, T.; CHÊNE, G. Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiretroviral therapy: emerging role of hepatitis and cancers, persistent role of AIDS. **International Journal of Epidemiology**. v. 34, n. 1, p. 121-130, 2005.

LIMA, D. T. Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. p.120, 2011.

LIN, D. B.; SU, K. E.; YU, J. C. Studies on cryopreservation of *Toxoplasma gondii* and its antigenicity in mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 53(4). p. 392-396, 1995.

LINDSTROM, I; KADDU-MULINDWA, D. H.; KIRONDE, F.; LINDH, J. Prevalence of latente and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. **Acta Tropical**, v. 100, p. 218-222, 2006.

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

LOPES, W. D. Z.; RODRIGUEZ, J. D.; SOUZA, F. A.; SANTOS, T. R.; SANTOS, R. S.; ROSANESE, W. M.; LOPES W. R. Z.; SAKAMOTO, C. A. M.; COSTA, A, J. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Veterinary Parasitology**. v.195, p. 47-56, 2013.

LUFT, R. Z.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmicencephalitis. **Journal of Infectious Diseases**, v.157, p.1-6, 1988.

KASPER, L.H. Infecção por toxoplasma. In: BRAUNWALD E., FAUCI A.S., KASPER D.L., HAUSER S.L., LONGO D.L., JAMESON J.L., **editors. Harrison medicina interna**. 15ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; p. 1294-8, 2002.

KWANTES, W., FLECK, D. G., AND PAYNE, R. A. Isolation and preservation of *Toxoplasma gondii*, **Journal of Clinical Pathology**, v. 20, p. 286-289, 1967.

KRAVETZ, J. D. & FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Assocition of Professors of Medicine**, v.118. p. 212-216, 2005.

MACHADO, H. S.; MENDONÇA, M. P.; OLIVEIRA, T. A.; SOUZA, H. M.; GARCIA, J. L.; LANGONI, H.; PEREIRA, V. B, R.; BRESCIANI, K. D. S.; SOARES, V. E.; COSTA, A. J. Congenital transmission in reinfected goats with *Toxoplasma gondii*. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. n.23, 2014.

MACKIE, M. J. (1972): Two years studies on the Eyles' glycerol preservation technique for *Toxoplasma gondii*, **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 846-847.

MAMIDI, A.; DESIMONE, J. A.; POMERANTZ, R. J. Central nervous system infectious in individuals with HIV-1 infection. **Journal of Neurovirology**, v. 8, n. 3, p.158-67, 2002.

MARANA, E. R. M., VENTURINI, A. C. H.; FREIRE, R. L. et al. Ocorrência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em rebanhos de bovinos de leite do norte do Paraná-Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.16, N. 1, P. 40-42, Mar. 1995.

MASSUMOTO, C. M., MIZUKAMI, S., CAMPOS, M.F., SILVA, L. A. G., MENDROME, J. R. A., SAKASHITA, A., ZAMBON, E., OSTRONOFF, M., MACEDO, M. C. A, MEDEIROS, R., DORLHIAC, P., CHAMONE, D., DULLEY, F. 1997. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43:93-98.

McDONALD'S, L.E. Veterinary endocrinology and reproduction, 5.ed. **Iowa: Iowa State Press**, p. 597, 2003.

MEDEIROS, C. M. O., FORELL, F., OLIVEIRA, A. T. D., RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002

MEGID, J., RIBEIRO, M. G., PAES, A. C. **Doença Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. 1. Ed. Roca: Rio de Janeiro. 1045. 2016.

MEIRELES, L., GALISTEO JR. A. J., ANDRADE JR. H. F. Pesquisa sorológica de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de produção do Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.267-271, 2003.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**. v. 8. p. 173-183, 1971.

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

MIYATA, A. On the cryo-biological study of the parasitic protozoa. (2) The low temperature preservation in freezers, **Tropical Medicine**, v. 15, p. 204-213, 1973B.

MITSUKA, R.; BECKNER DA SILVA, A. C.; NAVARRO, I. T.; BREGANÓ, J. FORAM.; VIDOTTO, O. *Toxoplasma gondii*: I. Avaliação da virulência de oito amostras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 35(1), 00, 1998.

MONTOYA, J. G. e LIENSENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. v. 363, p. 1965-1967, 2004.

MOREIRA, S.P.G., SAMARA, S.I., ARITA, G.M.M., FERREIRA, F., PEREIRA, G.T. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 3, p. 127-130, 2001.

MOURA, A. B.; COSTA, A. J.; FILHO, S. J.; PAIM, B. B.; PINTO, F. R.; DI MAURO, D. C. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27, p. 430-434, 2007

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M .R. & BARBOSA, H. S. Primary culture if intestinal ephithelial cells as a potencial model for *Toxplasma gondii* enteric cycle studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104. p. 862-864, 2009.

MUNIR, A.; ZAMAN, M.; ELTORKY, M. *Toxoplasma gondii* pneumonia in a pancreas transplant patient. **Southern Medical Journal**, v. 93, n. 6, p. 614-617, 2000.

NETTLETON, P. F.; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses-review. **British Veterinary Journal**, v. 151, n. 6, p. 615-642, 1995.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Occurence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brasil. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, 2005.

OLIVEIRA, E.C.S, JULIANI, G.C, MARQUES, Jr. A.P, HENRY, M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.1116-1122, 2006.

OLIVEIRA, A,V, VIVEIROS, A.T.M, MARIA, N.A, FREITAS, R.T.F, IZAÚ, Z.A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1509-1515, 2007.

PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiol Rev**. v. 29. p.897-910, 2005.

POTASMAN, I.; ARAUJO, F.G.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. *Toxoplasma gondii* antigens recognized by sequential sample of serum obtained from congenital lyinfants, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 1926-1931, 1987.

RESSELER, R., LE RAY, D., AND GOEDVRIEND, J. Conservation de protozoaires, particulièrement en culture, a la temperature de l'azote liquide, **Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale**, v.45, p. 665-678, 1965.

ROBL, V. Untersuchungen tiber die Moglichkeit der Lebendkonservierung von Toxoplasmen bei tiefen Temperaturen, 30 pp. Berlin. **Institute fur Veterinar-Parasitologie der Freien Universitat**, 1965

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

RIEMANN, H. P.; MEYER, M. E.; THEIS, J. H.; KELSO, G.; BEHYMER, D. E. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. **Journal of Pediatrics**, v. 87, p. 573-576, 1975.

SABIN, A.B. Toxoplasma encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**. v.116, p.87-89.

SACKS, J. J.; ROBERTO, R. R.; BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **The Journal of the American Medical Association**, v. 248, p. 1728-1732, 1982

SAMARA, S.I., DIAS, F.C., MOREIRA, S.P.G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**.v.41. p. 396-403, 2004.

SANCHES, E.G, OLIVEIRA, I.R, SERRALHEIRO, P.C.S. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Bioikos**, v.22, p.81-90, 2008.

SANGER, V.L.; CHAMBERLANI, K.W.; COLE, C.R.; FARREL, R.L. Toxoplasmosis isolation of *Toxoplasma gondii* from cattle. **The Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.123, p.87-91, 1953.

SANTANA, L. F.; COSTA, A. J.; PIERONI, J.; LOPES, W. D. Z.; SANTOS, R. S.; OLIVEIRA, G. P.; MENDONÇA, R. P.; SAKAMOTO, C. A. M. Detecion of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 179-182, 2010.

SANTANA, L. F.; ROSSI, G. A. M.; GASPAR, R. C.; PINTO, V. M. ROCHA.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA A. J. Evidence of sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in goats. **Small Ruminant Research**. v. 115, p. 130-133, 2013.

SANTOS, T. R.; FARIA, G.S. M.; GUERREIRO, B. M.; DAL PIETRO, N. H. P.; LOPES, W. D. Z.; SILVA, H. M.; GARCIA, J. L.; LUVIZOTTO, M. C. R.; BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J. Congenital toxoplasmosis in chronically infected and subsequently challenged ewes. **PLOS ONE**. p. 1-17, 2016.

SANTOS, T. R.; COSTA, A. J.; TONIOLLO, G.H.; LUVIZOTTO, M. C. R.; BENETTI, R. R.; MATTA, D. H.; LOPES, W. D. L.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, G. P. Prevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 161, p. 324-326.

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

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

SHARIF, M.; GHOLAMI, S. H.; ZIAEI, H.; DARYANI, A.; LAKTARASHI, B.; ZIAPOUR, S. P.; RAFIEI, A.; VAHEDI, M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 422-424, 2007.

SHERDING, R.G. Toxoplasmose, Neosporose e Outras Infecções Protozoárias sistêmicas. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. (eds). **Manual Saunders Clínica de Pequenos animais**. São Paulo, Editora Roca, p. 157-162, 1998.

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

SILVA, R.C. da.; SU, C.; LANGONI, H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.332-336, 2009.

SMITH, R. Method for storing *Toxoplasma gondii* (RH strain) in liquid nitrogen, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1011-1012, 1973.

SOARES H. S.; AHID S. M. M.; BEZERRA A. C. D. S.; PENA H. F. J.; DIAS R. A. & GENNARI S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 160. p. 211-214, 2009.

SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R. R.; RIBEIRO, L. C.; SILVEIRA, C.; GARCIA, A. P. E CAMILLO-COURA, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 4, p. 483-491, 2003.

SPEER, C. A.; DUBEY, D. J. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. **International Journal for Parasitology**. v. 35, p.193-206, 2005.

STALHEIM, O.H., PROCTOR, S.J., FAYER, R., LUNDE, M. Death na abortion in cows experimentally infected with *Sarcocystis* from dogs. **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**. v. 19. p. 317-327, 1980.

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

SU, S.C., GARBERS, S., RIEPER, T.D. TONIOLO, P. Temperature variations in upright mechanical freezers **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 5. p. 139-140, 1996.

TEALE, A. J., BLEWETT, D.A., MILLER, J.K. & BUXTON, D. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of *Toxoplasma*. **Veterinary Record**. v.11, p.53-55, 1982.

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

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62. p. 23-53, 2000;

VYSEKANTSEV, I. P., GURINA, T. M., MARTSENYUK, V. F., PETRENKO, T. F., KUDOKOTSEVA, E. V., KOSHCHIY, S. V., GROSHEVOY, M. I. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. **CryoLetters**. v. 26. p.401-408, 2005.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p871-891, 1995.

WILLIAMS, D. M, GRUMET, F. C, REMINGTON, J. S. Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. v. 19, p. 416-420. 1978.

WOLFE, J. & BRYANT, G. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24:438-450.

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

WORK, K. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the flesh of sheep, swine and cattle. **Acta Pathologica et Microbiologica. Scandinavica**. 71, 296-9, 1967.

ANEXOS

Tabela 9. Valores de referência para a espécie bovina (adultos).

Parâmetros	Unidade	Valores de referência
Temperatura retal	Celsius (°C)	37,8 a 39,2°C ¹
Frequência cardíaca	Batimentos por minuto (bpm)	60 a 80 ¹
Frequência respiratória	Movimentos por minuto (mpm)	24 a 36 ¹
		10 a 30 ²
Movimentos ruminais	Movimentos/3 minutos	1 a 3 ¹

Parâmetros	Unidade	Valores de referência ³
Eritrograma		
Hemácias	10 ⁶ /uL	5,0 - 10
Hemoglobina	g/dL	8,0 – 15,0
Hematócrito	%	24 - 46
VCM	fL	40 - 60
HCM	pg	11 - 17
CHCM	%	30 - 36
Leucograma		
Leucócitos	uL	4.000 – 12.000
Neutrófilos bastonetes	uL	0 – 120
	%	0 - 2
Neutrófilos segmentados	uL	600 - 4000
	%	15 - 45
Eosinófilos	uL	0 - 2400
	%	0 - 20
Basófilos	uL	0 - 200
	%	0 - 2
Monócitos	uL	25 - 840
	%	2 - 7
Linfócitos	uL	2500 - 7500
	%	45 - 75
Contagens de plaquetas	10 ³ /uL	200 - 600

¹FEITOSA, (2014).²DIRKSEN, (1993).³FELDMAN, ZINKL, JAIN, (2000).

Tabela 10. Resultados das comparações múltiplas dos parâmetros clínicos aferidos em fêmeas bovinas pertencentes aos dois grupos experimentais. CPPAR/FAV/UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.

Parâmetros Clínicos	Período Experimental	Grupos Experimentais / Médias e Desvios Padrões ¹	
		GC: Controle	GT: Infectado <i>Toxoplasma gondii</i>
Temperatura retal (°C)**	1	38,88 ± 0,43 Aa	38,54 ± 0,57 Aa
	3	38,80 ± 0,46 Aa	38,76 ± 0,44 Aa
	5	38,54 ± 0,53 Aa	38,68 ± 0,67 Aa
	7	38,66 ± 0,51 Aa	38,50 ± 0,46 Aa
	12	38,92 ± 0,54 Aa	38,84 ± 0,40 Aa
	14	38,64 ± 0,48 Aa	38,36 ± 0,24 Aa
	21	38,68 ± 0,54 Aa	38,54 ± 0,38 Aa
	28	39,00 ± 0,58 Aa	38,56 ± 0,31 Aa
	35	38,68 ± 0,47 Aa	38,56 ± 0,43 Aa
	42	38,66 ± 0,49 Aa	38,60 ± 0,34 Aa
	49	38,66 ± 0,49 Aa	38,60 ± 0,34 Aa
	56	38,78 ± 0,41 Aa	38,46 ± 0,44 Aa
	63	38,78 ± 0,48 Aa	38,70 ± 0,21 Aa
	70	38,90 ± 0,64 Aa	39,04 ± 0,47 Aa
	77	38,72 ± 0,61 Aa	39,18 ± 0,40 Aa
Frequência cardíaca*	1	67,60 ± 6,07 Ad	68,00 ± 10,95 Ad
	3	76,80 ± 18,63 Abcd	62,80 ± 18,58 Ad
	5	93,20 ± 9,12 Aa	93,60 ± 4,56 Aa
	7	93,60 ± 10,81 Aabc	91,60 ± 15,39 Aab
	12	85,60 ± 13,45 Aabc	88,80 ± 6,57 Aab
	14	94,40 ± 17,57 Aa	87,20 ± 7,16 Aab
	21	76,80 ± 7,69 Abcd	84,80 ± 5,93 Aab
	28	83,20 ± 9,86 Aabcd	82,40 ± 5,18 Aab
	35	74,00 ± 14,97 Acd	70,40 ± 12,12 Acd
	42	93,60 ± 14,59 Aa	85,60 ± 10,04 Aab
	49	94,80 ± 12,93 Aa	87,20 ± 10,35 Aab
	56	86,40 ± 16,64 Aabc	80,80 ± 3,35 Abc
	63	89,60 ± 3,29 Aabc	87,60 ± 7,27 Aab
	70	95,20 ± 14,25 Aab	94,00 ± 6,63 Aa
	77	90,40 ± 10,53 Aa	88,40 ± 10,43 Aab
Frequência respiratória**	1	34,00 ± 17,20 Aab	27,80 ± 14,91 Aa
	3	44,00 ± 13,93 Aa	27,20 ± 11,01 Aa
	5	36,40 ± 13,45 Aab	28,80 ± 13,90 Aa
	7	37,60 ± 5,37 Aab	29,40 ± 17,08 Aa
	12	37,20 ± 11,45 Aab	35,20 ± 16,59 Aa
	14	35,20 ± 6,57 Aab	30,40 ± 9,63 Aa
	21	34,80 ± 10,16 Aab	27,20 ± 8,67 Aa
	28	29,60 ± 4,56 Ab	24,00 ± 4,00 Aa
	35	32,00 ± 4,90 Aab	26,80 ± 2,68 Aa
	42	30,40 ± 7,27 Ab	27,20 ± 9,96 Aa
	49	31,60 ± 6,99 Aab	22,80 ± 3,35 Aa
	56	31,20 ± 11,10 Aab	22,00 ± 7,48 Aa
	63	34,40 ± 9,21 Aab	28,80 ± 7,69 Aa
	70	40,80 ± 11,80 Aab	27,20 ± 5,93 Aa
	77	34,40 ± 10,04 Aab	24,40 ± 8,99 Aa
Movimentos ruminais**	1	1,40 ± 0,55 Aab	1,60 ± 0,55 Aab
	3	1,00 ± 0,00 Ab	1,40 ± 0,55 Aab
	5	1,00 ± 0,00 Ab	1,40 ± 0,55 Aab
	7	1,20 ± 0,45 Aab	1,60 ± 0,55 Aab
	12	1,60 ± 0,55 Aab	1,60 ± 0,55 Aab
	14	1,60 ± 0,55 Aab	1,80 ± 0,45 Aab
	21	1,40 ± 0,55 Aab	1,60 ± 0,55 Aab
	28	1,20 ± 0,45 Aab	1,20 ± 0,45 Ab
	35	1,40 ± 0,55 Aab	1,40 ± 0,55 Aab
	42	1,40 ± 0,55 Aab	1,60 ± 0,55 Aab
	49	1,80 ± 0,45 Aa	1,60 ± 0,55 Aab
	56	1,80 ± 0,45 Aa	1,80 ± 0,45 Aab
	63	1,60 ± 0,55 Aab	2,00 ± 0,00 Aa
	70	1,60 ± 0,55 Aab	2,00 ± 0,00 Aa
	77	1,40 ± 0,55 Aab	1,60 ± 0,55 Aab

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t* ou Kruskal-Wallis** (p≥0,05)

Tabela 11. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pré-inseminação artificial (D-1); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pré-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D-1																			
		Eritrograma							Leucograma												Plaquetograma
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basofilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
								%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³		
3466	GC: Controle	7,5	11,0	41,5	56,0	14,7	26,5	13,9	0,0	0,0	35,0	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	8,3	5,0	0,7	202,0
1807		7,5	9,7	38,0	51,0	13,0	25,4	10,8	0,0	0,0	60,0	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0	32,0	3,5	8,0	0,9	521,0
39		10,1	11,0	41,7	41,0	10,9	26,3	18,9	0,0	0,0	40,0	7,6	2,0	0,4	0,0	0,0	58,0	11,0	0,0	0,0	309,0
2130		12,0	11,7	46,5	39,0	9,7	25,1	23,6	0,0	0,0	25,0	5,9	2,0	1,2	0,0	0,0	70,0	16,5	0,0	0,0	209,0
2007		9,5	12,2	45,9	48,0	12,7	26,5	13,9	0,0	0,0	45,0	6,3	0,0	0,0	0,0	0,0	55,0	7,6	0,0	0,0	672,0
	Média	9,3	11,1	42,7	47,0	12,2	26,0	16,2	0,0	0,0	41,0	6,2	0,8	0,3	0,0	0,0	55,0	9,4	2,6	0,3	382,6
	Desvio	1,9	0,9	3,5	7,0	1,9	0,7	5,0	0,0	0,0	12,9	1,0	1,1	0,5	0,0	0,0	14,0	4,8	3,7	0,4	206,8
	Mínimo	7,5	9,7	38,0	39,0	9,7	25,1	10,8	0,0	0,0	25,0	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0	32,0	3,5	0,0	0,0	202,0
	Máximo	12,0	12,2	46,5	56,0	14,7	26,5	23,6	0,0	0,0	60,0	7,6	2,0	1,2	0,0	0,0	70,0	16,5	8,0	0,9	672,0
2018	GT: Infectados com T. gondii (Amostra RH)	8,7	10,2	38,8	44,0	11,7	26,3	15,9	0,0	0,0	37,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	9,5	3,0	0,5	356,0
1008		9,6	11,5	44,6	46,0	12,0	25,9	11,5	0,0	0,0	45,0	5,2	5,0	0,6	0,0	0,0	45,0	5,2	5,0	0,6	313,0
3462		8,0	8,8	34,4	43,0	11,1	25,7	16,2	0,0	0,0	30,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	11,3	0,0	0,0	358,0
813		7,6	8,7	34,3	45,0	11,4	25,0	10,2	0,0	0,0	34,0	3,5	4,0	0,4	0,0	0,0	60,0	6,1	2,0	0,2	623,0
1108		8,1	7,3	28,3	35,0	9,0	25,8	11,8	0,0	0,0	52,0	6,1	1,0	0,1	0,0	0,0	45,0	5,3	2,0	0,2	405,0
	Média	8,4	9,3	36,1	42,6	11,0	25,7	13,1	0,0	0,0	39,6	5,1	2,0	0,2	0,0	0,0	56,0	7,5	2,4	0,3	411,0
	Desvio	0,8	1,6	6,1	4,4	1,2	0,5	2,7	0,0	0,0	8,8	1,1	2,3	0,3	0,0	0,0	10,8	2,8	1,8	0,2	122,9
	Mínimo	7,6	7,3	28,3	35,0	9,0	25,0	10,2	0,0	0,0	30,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	5,2	0,0	0,0	313,0
	Máximo	9,6	11,5	44,6	46,0	12,0	26,3	16,2	0,0	0,0	52,0	6,1	5,0	0,6	0,0	0,0	70,0	11,3	5,0	0,6	623,0

Tabela 12. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D1); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D1																					
Número do bovino	Grupo	Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	7,5	11,0	40,9	55,0	14,7	26,9	13,8	0,0	0,0	45,0	6,2	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	6,2	10,0	1,4	308,0
1807		7,1	9,8	36,1	51,0	13,8	27,2	9,8	1,0	0,1	34,0	3,3	3,0	0,3	0,0	0,0	60,0	5,9	2,0	0,2	524,0
39		10,1	11,0	41,7	41,0	10,9	26,3	18,9	0,0	0,0	69,0	10,7	0,0	0,0	0,0	0,0	34,0	6,1	6,0	1,1	374,0
2130		10,8	11,1	41,6	38,0	10,3	26,8	15,9	0,0	0,0	37,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	62,0	9,6	1,0	0,2	223,0
2007		9,8	11,3	51,2	45,0	13,2	25,8	14,1	0,0	0,0	40,0	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	8,5	0,0	0,0	580,0
	Média	9,1	10,8	42,3	46,0	12,6	26,6	14,5	0,2	0,0	45,0	6,4	0,6	0,1	0,0	0,0	52,2	7,2	3,8	0,6	401,8
	Desvio	1,7	0,6	5,5	7,0	1,9	0,6	3,3	0,4	0,0	14,0	2,7	1,3	0,1	0,0	0,0	12,3	1,7	4,1	0,6	148,5
	Minimo	7,1	9,8	36,1	38,0	10,3	25,8	9,8	0,0	0,0	34,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	34,0	5,9	0,0	0,0	223,0
	Máximo	10,8	11,3	51,2	55,0	14,7	27,2	18,9	1,0	0,1	69,0	10,7	3,0	0,3	0,0	0,0	62,0	9,6	10,0	1,4	580,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	8,8	10,3	38,5	44,0	11,7	26,8	15,5	0,0	0,0	45,0	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	7,8	5,0	0,8	638,0
1008		9,2	11,6	42,6	46,0	12,7	27,3	10,8	1,0	0,1	47,0	5,1	1,0	0,1	0,0	0,0	51,0	5,5	0,0	0,0	301,0
3462		8,6	9,2	36,0	42,0	10,8	25,7	17,3	0,0	0,0	28,0	4,8	8,0	1,4	0,0	0,0	62,0	10,7	2,0	0,4	397,0
813		7,2	8,3	32,5	45,0	11,5	25,5	12,0	0,0	0,0	49,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	6,0	1,0	0,1	840,0
1108		7,7	7,2	26,8	35,0	9,4	27,0	13,2	0,0	0,0	50,0	6,6	1,0	0,1	0,0	0,0	49,0	6,5	0,0	0,0	803,0
	Média	8,3	9,3	33,5	42,4	11,2	26,5	13,8	0,2	0,0	43,8	5,9	2,0	0,3	0,0	0,0	52,4	7,3	1,6	0,2	595,8
	Desvio	0,8	1,7	5,1	4,4	1,2	0,8	2,6	0,4	0,0	9,0	0,9	3,4	0,6	0,0	0,0	5,4	2,1	2,1	0,3	240,2
	Minimo	7,2	7,2	26,8	35,0	9,4	25,5	10,8	0,0	0,0	28,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	49,0	5,5	0,0	0,0	301,0
	Máximo	9,2	11,6	38,5	46,0	12,7	27,3	17,3	1,0	0,1	50,0	7,0	8,0	1,4	0,0	0,0	62,0	10,7	5,0	0,8	840,0

Tabela 13. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D3); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseimação artificial em tempo fixo (IATF)-D3																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm³)
									%	10 ³ /mm³	%	10 ³ /mm³	%	10 ³ /mm³	%	10 ³ /mm³	%	10 ³ /mm³	%	10 ³ /mm³	
3466	GC: Controle	7,2	10,3	39,3	54,0	14,2	26,1	13,0	0,0	0,0	32,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	66,0	8,6	2,0	0,3	191,0
1807		6,7	8,8	33,7	50,0	13,1	26,1	9,2	0,0	0,0	36,0	3,3	4,0	0,4	0,0	0,0	60,0	6,5	0,0	0,0	664,0
39		8,8	9,2	35,6	41,0	10,5	25,9	17,4	0,0	0,0	72,0	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	4,4	3,0	0,5	468,0
2130		10,7	11,0	41,3	39,0	10,3	26,6	19,7	0,0	0,0	50,0	9,9	2,0	0,4	0,0	0,0	46,0	9,1	2,0	0,4	320,0
2007		8,8	11,4	41,4	47,0	13,0	27,6	13,4	0,0	0,0	48,0	6,4	1,0	0,1	0,0	0,0	50,0	6,7	1,0	0,1	843,0
	Média	8,4	10,1	38,3	46,2	12,2	26,5	14,5	0,0	0,0	47,6	7,3	1,4	0,2	0,0	0,0	49,4	7,0	1,6	0,3	497,2
	Desvio	1,6	1,1	3,5	6,2	1,7	0,7	4,1	0,0	0,0	15,6	3,9	1,7	0,2	0,0	0,0	15,8	1,9	1,1	0,2	261,4
	Minimo	6,7	8,8	33,7	39,0	10,3	25,9	9,2	0,0	0,0	32,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	4,4	0,0	0,0	191,0
	Máximo	10,7	11,4	41,4	54,0	14,2	27,6	19,7	0,0	0,0	72,0	12,5	4,0	0,4	0,0	0,0	66,0	9,1	3,0	0,5	843,0
2018	GT: Infectados com T. gondii (Amostra RH)	9,3	10,9	40,7	44,0	11,7	26,8	17,1	0,0	0,0	43,0	7,4	2,0	0,4	0,0	0,0	55,0	9,4	0,0	0,0	509,0
1008		8,1	10,4	37,4	46,0	12,8	27,7	10,3	0,0	0,0	39,0	4,0	1,0	0,1	0,0	0,0	59,0	6,1	1,0	0,1	490,0
3462		7,6	8,8	32,2	42,0	11,6	27,3	19,2	0,0	0,0	49,0	9,4	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	9,6	1,0	0,2	474,0
813		6,8	8,0	30,0	44,0	11,8	26,6	12,7	0,0	0,0	55,0	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	5,7	0,0	0,0	450,0
1108		7,8	7,0	26,7	34,0	9,0	26,2	16,2	0,0	0,0	32,0	5,2	1,0	0,2	0,0	0,0	65,0	10,5	2,0	0,3	927,0
	Média	7,9	9,0	33,4	42,0	11,4	26,9	15,1	0,0	0,0	43,6	6,6	0,8	0,1	0,0	0,0	54,8	8,3	0,8	0,1	570,0
	Desvio	0,9	1,6	5,6	4,7	1,4	0,6	3,6	0,0	0,0	8,9	2,1	0,8	0,1	0,0	0,0	7,8	2,2	0,8	0,1	200,7
	Minimo	6,8	7,0	26,7	34,0	9,0	26,2	10,3	0,0	0,0	32,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	5,7	0,0	0,0	450,0
	Máximo	9,3	10,9	40,7	46,0	12,8	27,7	19,2	0,0	0,0	55,0	9,4	2,0	0,4	0,0	0,0	65,0	10,5	2,0	0,3	927,0

Tabela 14. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D5); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D5																					
Número do bovino	Grupo	Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ⁹ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	7,6	10,6	41,5	55,0	13,9	25,5	11,8	1,0	0,1	37,0	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	7,1	2,0	0,2	425,0
1807		7,5	10,0	38,1	51,0	13,2	26,2	9,5	0,0	0,0	31,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	67,0	6,4	2,0	0,2	617,0
39		NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**	NR**
2130		11,2	11,3	43,4	39,0	10,1	26,0	16,3	0,0	0,0	38,0	6,2	0,0	0,0	0,0	0,0	62,0	10,1	0,0	0,0	261,0
2007		9,7	11,9	46,0	48,0	12,3	25,8	14,3	0,0	0,0	47,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	7,2	3,0	0,4	362,0
	Média	9,0	11,0	42,3	48,3	12,4	25,9	13,0	0,3	0,0	38,3	5,1	0,0	0,0	0,0	0,0	59,8	7,7	1,8	0,2	416,3
	Desvio	1,8	0,8	3,3	6,8	1,7	0,3	3,0	0,5	0,1	6,6	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	1,7	1,3	0,2	149,9
	Mínimo	7,5	10,0	38,1	39,0	10,1	25,5	9,5	0,0	0,0	31,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	6,4	0,0	0,0	261,0
	Máximo	11,2	11,9	46,0	55,0	13,9	26,2	16,3	1,0	0,1	47,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	67,0	10,1	3,0	0,4	617,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	8,6	10,0	37,4	43,0	11,6	26,8	12,1	0,0	0,0	50,0	6,1	3,0	0,4	0,0	0,0	45,0	5,4	2,0	0,3	603,0
1008		9,0	11,0	41,9	47,0	12,3	26,3	12,0	0,0	0,0	69,0	8,3	1,0	0,1	0,0	0,0	30,0	3,6	0,0	0,0	422,0
3462		8,9	9,5	37,4	42,0	10,8	25,5	17,1	0,0	0,0	60,0	10,3	0,0	0,0	0,0	0,0	32,0	5,5	8,0	1,4	651,0
813		6,6	7,5	29,9	45,0	11,3	25,0	14,3	0,0	0,0	47,0	6,7	3,0	0,4	0,0	0,0	49,0	7,0	1,0	0,1	288,0
1108		7,8	7,0	27,3	35,0	9,0	25,7	18,2	0,0	0,0	33,0	6,0	2,0	0,4	0,0	0,0	62,0	11,3	3,0	0,6	946,0
	Média	8,2	9,0	34,8	42,4	11,0	25,9	14,7	0,0	0,0	51,8	7,5	1,8	0,3	0,0	0,0	43,6	6,6	2,8	0,5	582,0
	Desvio	1,0	1,7	6,0	4,6	1,2	0,7	2,8	0,0	0,0	13,6	1,8	1,3	0,2	0,0	0,0	13,1	2,9	3,1	0,6	249,9
	Mínimo	6,6	7,0	27,3	35,0	9,0	25,0	12,0	0,0	0,0	33,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	3,6	0,0	0,0	288,0
	Máximo	9,0	11,0	41,9	47,0	12,3	26,8	18,2	0,0	0,0	69,0	10,3	3,0	0,4	0,0	0,0	62,0	11,3	8,0	1,4	946,0

Tabela 15. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D7); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D7																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	9,4	10,6	51,5	55,0	11,3	20,6	14,2	1,0	0,1	29,0	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	65,0	9,2	5,0	0,7	352,0
1807		8,4	8,9	42,1	50,0	10,7	21,2	12,7	0,0	0,0	19,0	2,4	2,0	0,3	0,0	0,0	79,0	10,0	0,0	0,0	685,0
39		11,7	10,1	48,5	42,0	8,6	20,8	22,5	0,0	0,0	28,0	6,3	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	15,8	2,0	0,5	592,0
2130		15,2	12,1	59,7	39,0	7,9	20,2	23,0	0,0	0,0	68,0	15,6	4,0	0,9	0,0	0,0	28,0	6,4	0,0	0,0	387,0
2007		9,9	10,8	49,9	45	11,2	23,6	16,2	0	0	44	7,12	0	0	0	0	55	8,91	1	0,17	420
	Média	10,9	10,5	50,3	46,2	9,9	21,3	17,7	0,2	0,0	37,6	7,1	1,2	0,2	0,0	0,0	59,4	10,1	1,6	0,3	487,2
	Desvio	2,7	1,2	6,3	6,4	1,6	1,3	4,8	0,4	0,0	19,2	5,1	1,8	0,4	0,0	0,0	19,6	3,4	2,1	0,3	144,0
	Mínimo	8,4	8,9	42,1	39,0	7,9	20,2	12,7	0,0	0,0	19,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	28,0	6,4	0,0	0,0	352,0
	Máximo	15,2	12,1	59,7	55,0	11,3	23,6	23,0	1,0	0,1	68,0	15,6	4,0	0,9	0,0	0,0	79,0	15,8	5,0	0,7	685,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	11,4	10,9	50,1	44,0	9,5	21,7	14,8	0,0	0,0	62,0	9,2	5,0	0,7	0,0	0,0	30,0	4,4	3,0	0,4	264,0
1008		10,7	10,5	49,9	46,0	9,8	21,1	12,5	0,0	0,0	59,0	7,4	2,0	0,3	0,0	0,0	35,0	4,4	4,0	0,5	708,0
3462		11,9	10,5	50,5	42,0	8,8	20,7	20,4	0,0	0,0	42,0	8,6	0,0	0,0	0,0	0,0	54,0	11,0	4,0	0,8	736,0
813		8,9	8,3	40,0	45,0	9,3	20,7	28,4	0,0	0,0	60,0	17,0	1,0	0,9	0,0	0,0	36,0	10,2	3,0	0,3	400,0
1108		10,1	7,7	35,0	35,0	7,7	22,1	20,1	0,0	0,0	38,0	7,6	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	12,1	2,0	0,4	705,0
	Média	10,6	9,6	45,1	42,4	9,0	21,3	19,2	0,0	0,0	52,2	10,0	1,6	0,4	0,0	0,0	43,0	8,4	3,2	0,5	562,6
	Desvio	1,2	1,5	7,2	4,4	0,8	0,6	6,1	0,0	0,0	11,3	4,0	2,1	0,4	0,0	0,0	13,2	3,7	0,8	0,2	216,3
	Mínimo	8,9	7,7	35,0	35,0	7,7	20,7	12,5	0,0	0,0	38,0	7,4	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	4,4	2,0	0,3	264,0
	Máximo	11,9	10,9	50,5	46,0	9,8	22,1	28,4	0,0	0,0	62,0	17,0	5,0	0,9	0,0	0,0	60,0	12,1	4,0	0,8	736,0

Tabela 16. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D12); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D12																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ²)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	9,1	11,0	50,2	55,0	12,1	22,0	20,4	0,0	0,0	34,0	6,9	0,0	0,0	0,0	0,0	64,0	13,1	2,0	0,4	107,0
1807		8,4	9,3	42,9	51,0	11,0	21,7	12,7	0,0	0,0	28,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	8,9	2,0	0,3	661,0
39		11,5	10,5	47,8	42,0	9,1	21,9	31,0	0,0	0,0	38,0	11,8	0,0	0,0	0,0	0,0	62,0	19,2	0,0	0,0	198,0
2130		13,9	11,7	54,9	39,0	8,4	21,4	22,4	0,0	0,0	47,0	10,5	6,0	1,3	0,0	0,0	45,0	10,1	2,0	0,5	207,0
2007		12,3	12,3	58,8	48,0	10,0	20,9	16,3	0,0	0,0	34,0	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	65,0	10,6	2,0	0,2	772,0
	Média	11,0	11,0	50,9	47,0	10,1	21,6	20,6	0,0	0,0	36,2	7,7	1,2	0,3	0,0	0,0	61,2	12,4	1,6	0,3	389,0
	Desvio	2,3	1,2	6,2	6,5	1,5	0,4	6,9	0,0	0,0	7,0	3,4	2,7	0,6	0,0	0,0	9,5	4,1	0,9	0,2	304,1
	Mínimo	8,4	9,3	42,9	39,0	8,4	20,9	12,7	0,0	0,0	28,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	8,9	0,0	0,0	107,0
	Máximo	13,9	12,3	58,8	55,0	12,1	22,0	31,0	0,0	0,0	47,0	11,8	6,0	1,3	0,0	0,0	70,0	19,2	2,0	0,5	772,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	10,3	10,0	45,4	44,0	9,7	22,0	13,1	0,0	0,0	45,0	5,9	1,0	0,1	0,0	0,0	54,0	7,1	0,0	0,0	261,0
1008		10,9	11,2	51,5	47,0	10,3	21,7	15,2	0,0	0,0	65,0	9,9	0,0	0,0	0,0	0,0	33,0	5,0	2,0	0,3	604,0
3428		11,2	10,2	48,6	43,0	9,1	21,1	30,6	0,0	0,0	30,0	9,2	0,0	0,0	0,0	0,0	68,0	20,8	2,0	0,6	247,0
813		9,0	8,7	40,3	45,0	9,6	21,5	20,2	0,0	0,0	52,0	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	8,1	8,0	1,6	400,0
1108		9,9	7,8	34,4	34,0	7,8	22,5	19,3	0,0	0,0	25,0	4,8	2,0	0,4	0,0	0,0	69,0	13,3	4,0	0,8	691,0
	Média	10,3	9,6	44,0	42,6	9,3	21,8	19,7	0,0	0,0	43,4	8,1	0,6	0,1	0,0	0,0	52,8	10,9	3,2	0,7	440,6
	Desvio	0,9	1,3	6,8	5,0	0,9	0,5	6,8	0,0	0,0	16,3	2,5	0,9	0,2	0,0	0,0	16,2	6,3	3,0	0,6	200,5
	Mínimo	9,0	7,8	34,4	34,0	7,8	21,1	13,1	0,0	0,0	25,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	33,0	5,0	0,0	0,0	247,0
	Máximo	11,2	11,2	51,5	47,0	10,3	22,5	30,6	0,0	0,0	65,0	10,5	2,0	0,4	0,0	0,0	69,0	20,8	8,0	1,6	691,0

Tabela 17. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D14); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseimação artificial em tempo fixo (IATF)-D14																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	9,7	11,3	53,3	55,0	11,7	21,2	14,2	0,0	0,0	37,0	5,3	6,0	0,9	0,0	0,0	57,0	8,2	0,0	0,0	479,0
1807		9,0	10,0	46,8	52,0	11,1	21,4	12,9	1,0	0,1	40,0	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	56,0	7,2	3,0	0,4	347,0
39		11,2	10,2	48,9	44,0	9,1	20,9	25,6	0,0	0,0	34,0	8,7	1,0	0,3	0,0	0,0	63,0	16,1	2,0	0,5	321,0
2130		13,7	11,5	54,2	40,0	8,4	21,2	16,9	0,0	0,0	30,0	5,1	1,0	0,2	0,0	0,0	69,0	11,7	0,0	0,0	200,0
2007		8,9	12,1	41	35	15,6	31,7	13,1	0	0	32	4,19	0	0	0	0	66	8,65	2	0,26	612,0
	Média	10,5	11,0	48,8	45,2	10,4	23,3	16,5	0,2	0,0	34,6	5,7	1,6	0,3	0,0	0,0	62,2	10,8	1,4	0,2	391,8
	Desvio	2,0	0,9	5,3	8,3	1,8	4,7	5,3	0,4	0,0	4,0	1,7	2,5	0,4	0,0	0,0	5,6	4,0	1,3	0,2	158,0
	Mínimo	8,9	10,0	41,0	35,0	8,4	20,9	12,9	0,0	0,0	30,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	56,0	7,2	0,0	0,0	200,0
	Máximo	13,7	12,1	54,2	55,0	11,7	31,7	25,6	1,0	0,1	40,0	8,7	6,0	0,9	0,0	0,0	69,0	16,1	3,0	0,5	612,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	11,2	10,7	49,5	44,0	9,6	21,6	13,9	0	0	27,0	3,8	2,0	0,3	1,0	0,1	69,0	9,6	1,0	0,1	439,0
1008		11,1	11,3	52,9	48,0	10,3	21,4	12,9	0,0	0,0	47,0	6,1	0,0	0,0	0,0	0,0	48,0	6,2	5,0	0,7	704,0
3462		10,8	9,8	46,0	43,0	9,1	21,4	17,3	0,0	0,0	35,0	6,1	2,0	0,4	0,0	0,0	58,0	10,3	5,0	0,7	587,0
813		10,1	9,3	45,4	45,0	9,8	20,4	18,4	0,0	0,0	50,0	9,2	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	8,3	5,0	0,9	400,0
1108		10,0	8,4	38,3	35,0	7,7	21,9	18,9	0,0	0,0	30,0	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0	65,0	12,3	5,0	1,0	595,0
		10,6	9,9	46,4	43,0	9,3	21,3	16,3	0,0	0,0	37,8	6,1	0,8	0,1	0,2	0,0	57,0	9,3	4,2	0,7	545,0
	Desvio	0,5	1,1	5,4	4,8	1,0	0,6	2,7	0,0	0,0	10,2	2,0	1,1	0,2	0,4	0,1	10,4	2,3	1,8	0,3	124,3
	Mínimo	10,0	8,4	38,3	35,0	7,7	20,4	12,9	0,0	0,0	27,0	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	6,2	1,0	0,1	400,0
	Máximo	11,2	11,3	52,9	48,0	10,3	21,9	18,9	0,0	0,0	50,0	9,2	2,0	0,4	1,0	0,1	69,0	12,3	5,0	1,0	704,0

Tabela 18. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D21); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D21																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ²)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	9,8	11,4	54,2	55,0	11,7	21,1	17,6	0,0	0,0	32,0	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	65,0	11,4	3,0	0,5	140,0
1807		9,0	9,9	46,6	52,0	11,0	21,2	10,5	0,0	0,0	36,0	3,8	0,0	0,0	1,0	0,1	59,0	6,2	4,0	0,4	402,0
39		12,7	12,0	55,9	44,0	9,4	21,4	25,9	0,0	0,0	31,0	8,0	6,0	1,5	0,0	0,0	60,0	15,5	5,0	0,8	604,0
2130		13,8	11,7	55,1	40,0	8,5	21,2	22,5	0,0	0,0	29,0	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	15,8	1,0	0,2	312,0
2007		10,0	10,4	47,3	47,0	10,4	21,9	15,4	0,0	0,0	30,0	4,6	0,0	0,0	1,0	0,2	64,0	9,9	5,0	0,8	400,0
	Média	11,0	11,1	51,8	47,6	10,2	21,4	18,4	0,0	0,0	31,6	5,7	1,2	0,3	0,4	0,1	63,6	11,8	3,6	0,5	371,6
	Desvio	2,1	0,9	4,5	6,0	1,3	0,3	6,0	0,0	0,0	2,7	1,7	2,7	0,7	0,5	0,1	4,4	4,0	1,7	0,2	168,0
	Mínimo	9,0	9,9	46,6	40,0	8,5	21,1	10,5	0,0	0,0	29,0	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	59,0	6,2	1,0	0,2	140,0
	Máximo	13,8	12,0	55,9	55,0	11,7	21,9	25,9	0,0	0,0	36,0	8,0	6,0	1,5	1,0	0,2	70,0	15,8	5,0	0,8	604,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	10,4	10,0	46,9	45,0	9,6	21,4	14,4	0,0	0,0	39,0	5,6	3,0	0,4	0,0	0,0	58,0	8,4	0,0	0,0	315,0
1008		12,8	12,9	61,5	48,0	10,1	21,0	16,9	0,0	0,0	27,0	4,6	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	11,8	3,0	51,0	610,0
3462		11,7	10,6	50,7	43,0	9,0	20,9	20,3	0,0	0,0	39,0	7,9	7,0	0,1	0,0	0,0	54,0	11,0	0,0	0,0	299,0
813		10,0	9,2	44,4	45,0	9,3	20,8	15,0	0,0	0,0	46,0	6,9	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	7,5	4,0	0,6	190,0
1108		10,4	8,4	36,7	35,0	8,0	22,8	19,3	0,0	0,0	35,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	11,5	5,0	1,0	691,0
	Média	11,1	10,2	48,0	43,2	9,2	21,4	17,2	0,0	0,0	37,2	6,3	2,0	0,1	0,0	0,0	58,4	10,0	2,4	10,5	421,0
	Desvio	1,2	1,7	9,1	4,9	0,8	0,8	2,6	0,0	0,0	6,9	1,3	3,1	0,2	0,0	0,0	7,5	2,0	2,3	22,6	216,9
	Mínimo	10,0	8,4	36,7	35,0	8,0	20,8	14,4	0,0	0,0	27,0	4,6	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	7,5	0,0	0,0	190,0
	Máximo	12,8	12,9	61,5	48,0	10,1	22,8	20,3	0,0	0,0	46,0	7,9	7,0	0,4	0,0	0,0	70,0	11,8	5,0	51,0	691,0

Tabela 19. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D28); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Hemograma/Pós-inseimação artificial em tempo fixo (IATF)-D28																					
Número do bovino	Grupo	Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	7,3	12,9	40,3	55,0	17,5	32,0	17,3	0,0	0,0	49,0	8,5	2,0	0,4	0,0	0,0	48,0	8,3	1,0	0,2	153,0
1807		6,1	10,1	31,1	51,0	16,6	32,4	7,8	0,0	0,0	32,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	66,0	5,2	2,0	0,2	672,0
39		8,9	12,3	38,5	43,0	13,7	31,9	17,3	0,0	0,0	47,0	8,1	1,0	0,2	0,0	0,0	50,0	8,7	2,0	0,4	302,0
2130		9,9	12,4	39,1	40,0	12,6	31,6	20,5	0,0	0,0	20,0	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	75,0	15,4	5,0	1,0	154,0
2007		7,5	11,9	35,8	48,0	15,8	33,2	12,2	0,0	0,0	31,0	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	67,0	8,2	2,0	0,3	910,0
	Média	7,9	11,9	37,0	47,4	15,1	32,2	15,0	0,0	0,0	35,8	5,4	0,6	0,1	0,0	0,0	61,2	9,1	2,4	0,4	438,2
	Desvio	1,5	1,1	3,7	6,0	2,3	0,6	5,0	0,0	0,0	12,1	2,7	0,9	0,2	0,0	0,0	11,7	3,8	1,5	0,4	338,3
	Mínimo	6,1	10,1	31,1	40,0	12,6	31,6	7,8	0,0	0,0	20,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	48,0	5,2	1,0	0,2	153,0
	Máximo	9,9	12,9	40,3	55,0	17,5	33,2	20,5	0,0	0,0	49,0	8,5	2,0	0,4	0,0	0,0	75,0	15,4	5,0	1,0	910,0
2018	GT: Infectados com T. gondii (Amostra RH)	8,7	10,2	38,8	44,0	11,7	26,3	15,9	0,0	0,0	37,0	4,9	2,0	0,3	0,0	0,0	60,0	7,9	1,0	0,1	223,0
1008		8,7	13,0	41,0	47,0	15,0	31,7	10,2	0,0	0,0	40,0	4,1	2,0	0,2	1,0	0,1	57,0	5,8	0,0	0,0	410,0
3462		8,6	11,8	36,8	43,0	13,7	32,1	11,7	0,0	0,0	45,0	5,3	1,0	0,1	0,0	0,0	54,0	6,3	0,0	0,0	480,0
813		6,5	9,3	29,0	45,0	14,3	32,0	11,7	0,0	0,0	48,0	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	52,0	6,1	0,0	0,0	291,0
1108		7,3	8,5	24,8	34,0	11,7	34,3	14,6	0,0	0,0	39,0	5,7	0,0	0,0	1,0	0,1	60,0	8,8	0,0	0,0	469,0
	Média	8,0	10,6	34,1	42,6	13,3	31,3	12,8	0,0	0,0	41,8	5,1	1,0	0,1	0,4	0,0	56,6	7,0	0,2	0,0	374,6
	Desvio	1,0	1,8	6,9	5,0	1,5	3,0	2,3	0,0	0,0	4,5	0,7	1,0	0,1	0,5	0,1	3,6	1,3	0,4	0,1	113,2
	Mínimo	6,5	8,5	24,8	34,0	11,7	26,3	10,2	0,0	0,0	37,0	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	52,0	5,8	0,0	0,0	223,0
	Máximo	8,7	13,0	41,0	47,0	15,0	34,3	15,9	0,0	0,0	48,0	5,7	2,0	0,3	1,0	0,1	60,0	8,8	1,0	0,1	480,0

Tabela 20. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D35); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Hemograma/Pós-inseimação artificial em tempo fixo (IATF)-D35																						
Número do bovino	Grupo	Eritrograma							Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)	
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³		
3466	GC: Controle	7,4	13,2	39,6	54,8	17,5	32,0	21,0	0,0	0,0	45,0	9,5	1,0	0,2	0,0	0,0	52,0	10,9	2,0	0,4	129,0	
1807		6,8	11,5	34,5	52,0	16,6	32,4	8,5	0,0	0,0	35,0	3,0	2,0	0,2	0,0	0,0	62,0	5,3	1,0	0,1	453,0	
39		7,3	13,6	40,9	44,0	13,7	31,9	19,5	0,0	0,0	37,0	7,2	0,0	0,0	0,0	0,0	63,0	12,3	0,0	0,0	356,0	
2130		7,3	13,6	40,7	40,0	12,6	31,6	23,5	0,0	0,0	49,0	11,5	0,0	0,0	1,0	0,2	50,0	11,8	0,0	0,0	413,0	
2007		7,0	12,5	37,5	48,0	15,8	33,2	10,9	0,0	0,0	25,0	27,2	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	7,6	5,0	0,5	740,0	
	Média	7,1	12,9	38,6	47,8	15,1	32,2	16,7	0,0	0,0	38,2	11,7	0,6	0,1	0,2	0,0	59,4	9,6	1,6	0,2	418,2	
	Desvio	0,3	0,9	2,7	6,0	2,3	0,6	6,6	0,0	0,0	9,3	9,2	0,9	0,1	0,4	0,1	8,3	3,0	2,1	0,3	219,3	
	Mínimo	6,8	11,5	34,5	40,0	12,6	31,6	8,5	0,0	0,0	25,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	5,3	0,0	0,0	129,0	
	Máximo	7,4	13,6	40,9	54,8	17,5	33,2	23,5	0,0	0,0	49,0	27,2	2,0	0,2	1,0	0,2	70,0	12,3	5,0	0,5	740,0	
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	6,5	10,4	31,2	44,0	10,7	22,2	11,4	0,0	0,0	40,0	4,6	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	6,8	0,0	0,0	370,0	
1008		7,4	13,1	39,2	47,0	15,0	34,7	10,5	0,0	0,0	39,0	4,1	5,0	0,5	0,0	0,0	55,0	5,8	1,0	0,1	395,0	
3462		7,6	12,8	38,5	43,0	13,7	32,1	9,7	0,0	0,0	48,0	4,7	1,0	0,1	0,0	0,0	51,0	4,9	0,0	0,0	510,0	
813		5,0	9,1	27,3	45,0	14,3	30,0	7,4	0,0	0,0	67,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	2,2	3,0	0,2	342,0	
1108		5,0	7,7	23,0	34,0	11,7	34,3	17,2	0,0	0,0	54,0	9,3	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	7,7	1,0	0,2	361,0	
	Média	6,3	10,6	31,8	42,6	13,1	30,7	11,2	0,0	0,0	49,6	5,5	1,2	0,1	0,0	0,0	48,2	5,5	1,0	0,1	395,6	
	Desvio	1,3	2,3	7,0	5,0	1,8	5,1	3,6	0,0	0,0	11,5	2,1	2,2	0,2	0,0	0,0	11,6	2,1	1,2	0,1	66,7	
	Mínimo	5,0	7,7	23,0	34,0	10,7	22,2	7,4	0,0	0,0	39,0	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	2,2	0,0	0,0	342,0	
	Máximo	7,6	13,1	39,2	47,0	15,0	34,7	17,2	0,0	0,0	67,0	9,3	5,0	0,5	0,0	0,0	60,0	7,7	3,0	0,2	510,0	

Tabela 21. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D42); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D42																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	7,8	11,8	34,0	44,0	15,0	35,0	19,0	0,0	0,0	49,1	9,3	1,6	0,3	0,0	0,0	46,3	8,8	2,9	0,6	170,0
1807		7,1	10,4	32,0	45,0	15,0	33,0	9,0	0,0	0,0	33,0	3,0	4,0	0,4	0,0	0,0	59,0	5,3	1,0	0,4	394,0
39		7,8	11,6	35,0	45,0	15,0	33,0	21,0	0,0	0,0	45,0	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0	55,0	11,5	0,0	0,0	320,0
2130		8,0	12,1	36,0	45,0	15,0	34,0	22,3	0,0	0,0	49,0	10,9	0,0	0,0	0,0	0,0	51,0	11,4	0,0	0,0	320,0
2007		7,2	10,8	32,0	44,0	15,0	34,0	10,1	0,0	0,0	36,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	61,0	6,2	3,0	3,0	650,0
	Média	7,6	11,3	33,8	44,6	15,0	33,8	16,3	0,0	0,0	42,4	7,3	1,1	0,1	0,0	0,0	54,5	8,6	1,4	0,8	370,8
	Desvio	0,4	0,7	1,8	0,5	0,0	0,8	6,3	0,0	0,0	7,5	3,7	1,8	0,2	0,0	0,0	6,0	2,9	1,5	1,3	176,0
	Mínimo	7,1	10,4	32,0	44,0	15,0	33,0	9,0	0,0	0,0	33,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,3	5,3	0,0	0,0	170,0
	Máximo	8,0	12,1	36,0	45,0	15,0	35,0	22,3	0,0	0,0	49,1	10,9	4,0	0,4	0,0	0,0	61,0	11,5	3,0	3,0	650,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	7,5	11,3	34,0	45,0	15,0	33,0	9,9	0,0	0,0	36,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	61,0	6,0	3,0	0,3	294,0
1008		7,7	11,7	34,0	44,0	15,0	34,0	8,6	0,0	0,0	24,0	2,1	6,0	0,5	0,0	0,0	65,0	5,6	5,0	0,4	312,0
3462		8,1	12,4	37,0	46,0	15,0	34,0	9,6	0,0	0,0	31,0	3,0	6,0	0,6	0,0	0,0	59,0	5,7	4,0	0,4	466,0
813		6,9	10,4	31,0	45,0	15,0	34,0	8,9	0,0	0,0	33,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	64,0	5,7	3,0	0,3	298,0
1108		6,8	10,0	30,0	44,0	15,0	33,0	18,3	0,0	0,0	46,0	8,4	0,0	0,0	0,0	0,0	52,0	9,6	2,0	0,3	412,0
	Média	7,4	11,2	33,2	44,8	15,0	33,6	11,1	0,0	0,0	34,0	4,0	2,4	0,2	0,0	0,0	60,2	6,5	3,4	0,3	356,4
	Desvio	0,5	1,0	2,8	0,8	0,0	0,5	4,1	0,0	0,0	8,0	2,5	3,3	0,3	0,0	0,0	5,2	1,7	1,1	0,1	78,1
	Mínimo	6,8	10,0	30,0	44,0	15,0	33,0	8,6	0,0	0,0	24,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	52,0	5,6	2,0	0,3	294,0
	Máximo	8,1	12,4	37,0	46,0	15,0	34,0	18,3	0,0	0,0	46,0	8,4	6,0	0,6	0,0	0,0	65,0	9,6	5,0	0,4	466,0

Tabela 22. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D49); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Hemograma/Pré-inseimação artificial em tempo fixo (IATF)-D49																						
Número do bovino	Grupo	Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma		
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)	
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³		
3466	GC: Controle	7,1	10,6	32,0	45,0	15,0	33,0	17,9	0,0	0,0	51,0	9,1	3,0	0,3	0,0	0,0	45,0	8,0	2,0	0,4	222,0	
1807		7,5	11,4	34,0	45,0	15,0	34,0	8,5	0,0	0,0	32,0	2,7	6,0	0,5	0,0	0,0	59,0	5,0	3,0	0,6	344,0	
39		6,8	10,0	30,0	44,0	15,0	33,0	19,9	0,0	0,0	44,0	8,8	0,0	0,0	0,0	0,0	56,0	11,1	0,0	0,0	300,0	
2130		6,3	9,4	28,0	44,0	15,0	34,0	21,0	0,0	0,0	48,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	52,0	11,0	0,0	0,0	331,0	
2007		6,6	10,0	30,0	45,0	15,0	33,0	9,6	0,0	0,0	34,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	64,0	6,1	2,0	0,2	590,0	
	Média	6,9	10,3	30,8	44,6	15,0	33,4	15,4	0,0	0,0	41,8	6,8	1,8	0,2	0,0	0,0	55,2	8,2	1,4	0,2	357,4	
	Desvio	0,5	0,8	2,3	0,5	0,0	0,5	5,9	0,0	0,0	8,4	3,5	2,7	0,2	0,0	0,0	7,2	2,8	1,3	0,2	138,4	
	Mínimo	6,3	9,4	28,0	44,0	15,0	33,0	8,5	0,0	0,0	32,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	5,0	0,0	0,0	222,0	
	Máximo	7,5	11,4	34,0	45,0	15,0	34,0	21,0	0,0	0,0	51,0	10,0	6,0	0,5	0,0	0,0	64,0	11,1	3,0	0,6	590,0	
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	7,1	10,7	32,0	45,0	15,0	33,0	9,1	0,0	0,0	27,0	2,5	6,0	0,5	0,0	0,0	65,0	5,9	2,0	0,2	303,0	
1008		8,1	12,3	37,0	46,0	15,0	33,0	9,8	0,0	0,0	28,0	2,7	7,0	0,7	0,0	0,0	61,0	6,0	3,0	0,3	388,0	
3462		7,7	11,8	35,0	45,0	15,0	34,0	10,0	0,0	0,0	23,0	2,3	6,0	0,6	0,0	0,0	69,0	6,9	2,0	0,2	361,0	
813		7,0	10,7	32,0	46,0	15,0	33,0	9,0	0,0	0,0	28,0	2,5	5,0	0,5	0,0	0,0	62,0	5,6	3,0	0,3	322,0	
1108		8,0	11,7	35,0	44,0	15,0	33,0	17,8	0,0	0,0	44,0	7,8	0,0	0,0	0,0	0,0	54,0	9,6	2,0	0,3	384,0	
	Média	7,6	11,4	34,2	45,2	15,0	33,2	11,1	0,0	0,0	30,0	3,6	4,8	0,4	0,0	0,0	62,2	6,8	2,4	0,2	351,6	
	Desvio	0,5	0,7	2,2	0,8	0,0	0,4	3,7	0,0	0,0	8,1	2,4	2,8	0,3	0,0	0,0	5,5	1,6	0,5	0,1	37,8	
	Mínimo	7,0	10,7	32,0	44,0	15,0	33,0	9,0	0,0	0,0	23,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	54,0	5,6	2,0	0,2	303,0	
	Máximo	8,1	12,3	37,0	46,0	15,0	34,0	17,8	0,0	0,0	44,0	7,8	7,0	0,7	0,0	0,0	69,0	9,6	3,0	0,3	388,0	

Tabela 23. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D56); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D56																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	7,8	11,7	35,0	45,0	15,0	33,0	18,7	0,0	0,0	48,0	9,0	2,0	0,4	0,0	0,0	47,0	8,8	3,0	0,5	354,0
1807		7,3	11,2	33,0	45,0	15,0	34,0	9,6	0,0	0,0	30,0	2,9	6,0	0,6	0,0	0,0	61,0	5,9	3,0	0,3	402,0
39		7,6	11,6	35,0	46,0	15,0	33,0	18,0	0,0	0,0	42,0	7,6	0,0	0,0	0,0	0,0	58,0	10,4	0,0	0,0	330,0
2130		7,2	10,4	31,0	43,0	14,0	34,0	19,1	0,0	0,0	44,0	8,4	0,0	0,0	0,0	0,0	54,0	10,3	2,0	0,4	360,0
2007		6,2	9,4	28,0	45,0	15,0	34,0	10,1	0,0	0,0	27,0	2,7	3,0	0,3	0,0	0,0	65,0	6,6	5,0	0,5	420,0
	Média	7,2	10,9	32,4	44,8	14,8	33,6	15,1	0,0	0,0	38,2	6,1	2,2	0,2	0,0	0,0	57,0	8,4	2,6	0,3	373,2
	Desvio	0,7	1,0	3,0	1,1	0,4	0,5	4,8	0,0	0,0	9,2	3,1	2,5	0,2	0,0	0,0	6,9	2,1	1,8	0,2	36,8
	Mínimo	6,2	9,4	28,0	43,0	14,0	33,0	9,6	0,0	0,0	27,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	47,0	5,9	0,0	0,0	330,0
	Máximo	7,8	11,7	35,0	46,0	15,0	34,0	19,1	0,0	0,0	48,0	9,0	6,0	0,6	0,0	0,0	65,0	10,4	5,0	0,5	420,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	6,5	10,1	30,0	46,0	16,0	34,0	8,9	0,0	0,0	32,0	2,8	6,0	0,5	0,0	0,0	60,0	5,3	2,0	0,2	341,0
1008		6,9	10,4	31,0	45,0	15,0	33,0	8,7	0,0	0,0	33,0	2,9	7,0	0,6	0,0	0,0	58,0	5,0	2,0	0,2	316,0
3462		7,5	11,0	33,0	44,0	15,0	33,0	11,4	0,0	0,0	24,0	2,7	5,0	0,6	0,0	0,0	68,0	7,8	2,0	0,3	296,0
813		7,2	11,2	33,0	46,0	16,0	34,0	8,9	0,0	0,0	29,0	2,6	7,0	0,6	0,0	0,0	61,0	5,4	3,0	0,3	394,0
1108		7,2	10,7	32,0	44,0	15,0	33,0	18,3	0,0	0,0	45,0	8,2	0,0	0,0	0,0	0,0	52,0	9,5	3,0	0,6	300,0
	Média	7,1	10,7	31,8	45,0	15,4	33,4	11,2	0,0	0,0	32,6	3,9	5,0	0,5	0,0	0,0	59,8	6,6	2,4	0,3	329,4
	Desvio	0,4	0,4	1,3	1,0	0,5	0,5	4,1	0,0	0,0	7,8	2,4	2,9	0,3	0,0	0,0	5,8	1,9	0,5	0,2	40,2
	Mínimo	6,5	10,1	30,0	44,0	15,0	33,0	8,7	0,0	0,0	24,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	52,0	5,0	2,0	0,2	296,0
	Máximo	7,5	11,2	33,0	46,0	16,0	34,0	18,3	0,0	0,0	45,0	8,2	7,0	0,6	0,0	0,0	68,0	9,5	3,0	0,6	394,0

Tabela 24. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D63); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-63																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ³)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	8,4	12,5	38,0	45,0	15,0	33,0	19,0	0,0	0,0	46,0	8,7	3,0	0,6	0,0	0,0	49,0	9,3	2,0	0,4	266,0
1807		8,7	13,2	39,0	45,0	15,0	34,0	10,1	0,0	0,0	36,0	3,6	4,0	0,4	0,0	0,0	57,0	5,8	3,0	0,3	348,0
39		8,5	12,6	38,0	45,0	15,0	33,0	17,7	0,0	0,0	42,0	7,4	0,0	0,0	0,0	0,0	56,0	9,9	2,0	0,4	318,0
2130		6,7	10,1	30,0	45,0	15,0	34,0	20,1	0,0	0,0	45,0	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,0	10,6	2,0	0,4	434,0
2007		6,3	9,6	29,0	46,0	15,0	33,0	9,3	0,0	0,0	24,0	2,2	4,0	0,4	0,0	0,0	68,0	6,3	4,0	0,4	396,0
	Média	7,7	11,6	34,8	45,2	15,0	33,4	15,2	0,0	0,0	38,6	6,2	2,2	0,3	0,0	0,0	56,6	8,4	2,6	0,4	352,4
	Desvio	1,1	1,6	4,9	0,4	0,0	0,5	5,1	0,0	0,0	9,0	3,1	2,0	0,3	0,0	0,0	7,1	2,2	0,9	0,0	65,6
	Mínimo	6,3	9,6	29,0	45,0	15,0	33,0	9,3	0,0	0,0	24,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	49,0	5,8	2,0	0,3	266,0
	Máximo	8,7	13,2	39,0	46,0	15,0	34,0	20,1	0,0	0,0	46,0	9,0	4,0	0,6	0,0	0,0	68,0	10,6	4,0	0,4	434,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	6,1	9,4	28,0	46,0	15,0	34,0	9,9	0,0	0,0	25,0	2,5	4,0	0,4	0,0	0,0	68,0	6,7	3,0	0,3	295,0
1008		6,3	9,4	28,0	44,0	15,0	34,0	7,9	0,0	0,0	31,0	2,4	6,0	0,5	0,0	0,0	61,0	4,8	2,0	0,2	384,0
3462		6,2	9,1	27,0	44,0	15,0	34,0	9,8	0,0	0,0	31,0	3,0	4,0	0,4	0,0	0,0	60,0	5,9	5,0	0,5	309,0
813		7,2	8,6	26,0	36,0	12,0	33,0	10,8	0,0	0,0	33,0	3,6	4,0	0,4	0,0	0,0	59,0	6,4	4,0	0,4	301,0
1108		7,8	11,8	35,0	45,0	15,0	34,0	17,2	0,0	0,0	41,0	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	57,0	9,8	2,0	0,3	389,0
	Média	6,7	9,7	28,8	43,0	14,4	33,8	11,1	0,0	0,0	32,2	3,7	3,6	0,3	0,0	0,0	61,0	6,7	3,2	0,3	335,6
	Desvio	0,7	1,2	3,6	4,0	1,3	0,4	3,6	0,0	0,0	5,8	1,9	2,2	0,2	0,0	0,0	4,2	1,9	1,3	0,1	46,8
	Mínimo	6,1	8,6	26,0	36,0	12,0	33,0	7,9	0,0	0,0	25,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	57,0	4,8	2,0	0,2	295,0
	Máximo	7,8	11,8	35,0	46,0	15,0	34,0	17,2	0,0	0,0	41,0	7,0	6,0	0,5	0,0	0,0	68,0	9,8	5,0	0,5	389,0

Tabela 25. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D70); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF)-D70																			
		Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁹ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	6,9	10,0	30,0	43,0	14,0	33,0	18,2	0,0	0,0	44,0	8,0	2,0	0,4	0,0	0,0	51,0	9,4	2,0	0,4	371,0
1807		7,2	10,3	31,0	43,0	14,0	33,0	10,3	0,0	0,0	33,0	3,4	3,0	0,3	0,0	0,0	62,0	6,4	2,0	0,2	367,0
39		7,1	10,4	31,0	44,0	15,0	34,0	19,0	0,0	0,0	43,0	8,2	0,0	0,0	0,0	0,0	54,0	10,3	0,6	0,4	384,0
2130		7,8	9,5	28,0	36,0	12,0	34,0	19,7	0,0	0,0	47,0	9,3	0,0	0,0	0,0	0,0	53,0	10,4	0,0	0,0	366,0
2007		7,6	10,9	33,0	43,0	14,0	33,0	11,3	0,0	0,0	28,0	3,2	5,0	0,6	0,0	0,0	64,0	0,3	3,0	0,3	422,0
	Média	7,3	10,2	30,6	41,8	13,8	33,4	15,7	0,0	0,0	39,0	6,4	2,0	0,2	0,0	0,0	56,8	7,4	1,5	0,3	382,0
	Desvio	0,4	0,5	1,8	3,3	1,1	0,5	4,5	0,0	0,0	8,1	2,9	2,1	0,2	0,0	0,0	5,8	4,2	1,2	0,2	23,5
	Mínimo	6,9	9,5	28,0	36,0	12,0	33,0	10,3	0,0	0,0	28,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	51,0	0,3	0,0	0,0	366,0
	Máximo	7,8	10,9	33,0	44,0	15,0	34,0	19,7	0,0	0,0	47,0	9,3	5,0	0,6	0,0	0,0	64,0	10,4	3,0	0,4	422,0
2018	GT: Infectados com <i>T. gondii</i> (Amostra RH)	7,0	10,2	31,0	44,0	15,0	33,0	9,6	0,0	0,0	34,0	3,3	5,0	0,5	0,0	0,0	58,0	5,6	3,0	0,3	409,0
1008		6,3	9,0	27,0	43,0	14,0	33,0	8,6	0,0	0,0	37,0	2,2	3,0	0,3	0,0	0,0	56,0	4,8	4,0	0,3	463,0
3462		8,2	12,0	36,0	44,0	15,0	33,0	10,5	0,0	0,0	38,0	4,0	3,0	0,3	0,0	0,0	66,0	6,9	3,0	0,3	416,0
813		8,3	12,2	36,0	43,0	15,0	34,0	9,7	0,0	0,0	29,0	2,8	7,0	0,7	0,0	0,0	61,0	5,9	3,0	0,3	385,0
1108		7,4	10,6	32,0	43,0	14,0	33,0	16,8	0,0	0,0	43,0	7,0	2,0	0,3	0,0	0,0	52,0	9,0	3,0	0,5	446,0
	Média	7,4	10,8	32,4	43,4	14,6	33,2	11,0	0,0	0,0	36,2	3,8	4,0	0,4	0,0	0,0	58,6	6,4	3,2	0,3	423,8
	Desvio	0,8	1,3	3,8	0,5	0,5	0,4	3,3	0,0	0,0	5,2	1,9	2,0	0,2	0,0	0,0	5,3	1,6	0,4	0,1	30,9
	Mínimo	6,3	9,0	27,0	43,0	14,0	33,0	8,6	0,0	0,0	29,0	2,2	2,0	0,3	0,0	0,0	52,0	4,8	3,0	0,3	385,0
	Máximo	8,3	12,2	36,0	44,0	15,0	34,0	16,8	0,0	0,0	43,0	7,0	7,0	0,7	0,0	0,0	66,0	9,0	4,0	0,5	463,0

**Amostra com hemólise

Tabela 26. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D77); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

HemogramaPós-inseimação artificial em tempo fixo (IATF)-D77																					
Número do bovino	Grupo	Eritrograma						Leucograma												Plaquetograma	
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basófilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	7,1	10,7	32,0	45,0	15,0	33,0	19,1	0,0	0,0	31,0	4,1	2,0	0,0	0,0	0,0	64,0	9,2	3,0	0,7	341,0
1807		7,4	11,2	34,0	46,0	15,0	33,0	8,6	0,0	0,0	32,0	2,8	4,0	0,3	0,0	0,0	59,0	5,1	5,0	0,4	458,0
39		7,4	11,8	33,0	45,0	16,0	36,0	20,3	0,0	0,0	40,0	8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	58,0	11,8	2,0	0,4	422,0
2130		6,6	10,0	30,0	45,0	15,0	33,0	20,9	0,0	0,0	49,0	10,2	4,0	0,9	0,0	0,0	51,0	10,7	0,0	0,0	318,0
2007		7,4	11,4	34,0	46,0	15,0	34,0	7,2	0,0	0,0	37,0	2,7	3,0	0,2	0,0	0,0	56,0	4,0	4,0	0,3	466,0
	Média	7,2	11,0	32,6	45,4	15,2	33,8	15,2	0,0	0,0	37,8	5,6	2,6	0,3	0,0	0,0	57,6	8,2	2,8	0,4	401,0
	Desvio	0,3	0,7	1,7	0,5	0,4	1,3	6,7	0,0	0,0	7,3	3,4	1,7	0,4	0,0	0,0	4,7	3,4	1,9	0,3	67,8
	Mínimo	6,6	10,0	30,0	45,0	15,0	33,0	7,2	0,0	0,0	31,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	51,0	4,0	0,0	0,0	318,0
	Máximo	7,4	11,8	34,0	46,0	16,0	36,0	20,9	0,0	0,0	49,0	10,2	4,0	0,9	0,0	0,0	64,0	11,8	5,0	0,7	466,0
2018	GT: Infectados com T. gondii (Amostra RH)	7,1	10,8	32,0	45,0	15,0	34,0	9,0	0,0	0,0	40,0	3,6	5,0	0,5	0,0	0,0	51,0	4,6	4,0	0,3	308,0
1008		7,5	11,8	34,0	45,0	15,0	35,0	8,2	0,0	0,0	38,0	3,1	6,0	0,5	0,0	0,0	52,0	4,3	4,0	0,3	466,0
3462		7,7	11,7	35,0	45,0	15,0	35,0	10,4	0,0	0,0	34,0	3,5	4,0	0,4	0,0	0,0	58,0	6,0	4,0	0,5	267,0
813		6,6	10,0	30,0	45,0	15,0	33,0	10,1	0,0	0,0	38,0	3,8	3,0	0,3	0,0	0,0	55,0	5,6	4,0	0,4	341,0
1108		7,0	10,5	32,0	46,0	15,0	33,0	17,5	0,0	0,0	43,0	7,5	2,0	0,4	0,0	0,0	53,0	9,2	2,0	0,4	490,0
	Média	7,2	11,0	32,6	45,2	15,0	34,0	11,0	0,0	0,0	38,6	4,3	4,0	0,4	0,0	0,0	53,8	5,9	3,6	0,4	374,4
	Desvio	0,4	0,8	1,9	0,4	0,0	1,0	3,7	0,0	0,0	3,3	1,8	1,6	0,1	0,0	0,0	2,8	2,0	0,9	0,1	98,5
	Mínimo	6,6	10,0	30,0	45,0	15,0	33,0	8,2	0,0	0,0	34,0	3,1	2,0	0,3	0,0	0,0	51,0	4,3	2,0	0,3	267,0
	Máximo	7,7	11,8	35,0	46,0	15,0	35,0	17,5	0,0	0,0	43,0	7,5	6,0	0,5	0,0	0,0	58,0	9,2	4,0	0,5	490,0

Tabela 27. Valores hematológicos de vacas pertencentes aos grupos controle e experimentalmente infectado com *Toxoplasma gondii** (amostra RH), pós-inseminação artificial (D100); CPPAR/FCAV/UNESP - Jaboticabal - SP, Brasil.

Número do bovino	Grupo	Hemograma/Pós-inseimação artificial em tempo fixo (IATF)-D100																			
		Eritrograma							Leucograma												Plaquetograma
		Hemácias (x10 ⁶ /mm ²)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Leucócitos (10 ³ /mm ²)	Bastonetes (%)		Segmentados (%)		Eosinófilos (%)		Basofilos (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)
									%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	%	10 ³ /mm ³	
3466	GC: Controle	7,4	11,2	34,0	46,0	15,0	33,0	18,9	0,0	0,0	41,0	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	56,0	10,6	3,0	0,6	402,0
1807		6,8	10,1	30,0	44,0	15,0	34,0	8,8	0,0	0,0	35,0	3,1	4,0	0,4	0,0	0,0	57,0	4,9	4,0	0,4	402,0
39		6,9	10,5	31,0	45,0	15,0	34,0	20,5	0,0	0,0	48,0	9,8	0,0	0,0	0,0	0,0	52,0	10,7	0,0	0,0	300,0
2130		7,1	10,5	32,0	45,0	15,0	33,0	18,6	0,0	0,0	47,0	8,7	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	9,3	3,0	0,6	381,0
2007		7,4	10,2	31,0	42,0	14,0	33,0	10,0	0,0	0,0	35,0	3,5	3,0	0,3	0,0	0,0	58,0	5,8	4,0	0,4	501,0
	Média	7,1	10,5	31,6	44,4	14,8	33,4	15,4	0,0	0,0	41,2	6,6	1,4	0,1	0,0	0,0	54,6	8,3	2,8	0,4	397,2
	Desvio	0,3	0,4	1,5	1,5	0,4	0,5	5,5	0,0	0,0	6,3	3,1	1,9	0,2	0,0	0,0	3,4	2,7	1,6	0,2	71,6
	Mínimo	6,8	10,1	30,0	42,0	14,0	33,0	8,8	0,0	0,0	35,0	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	4,9	0,0	0,0	300,0
	Máximo	7,4	11,2	34,0	46,0	15,0	34,0	20,5	0,0	0,0	48,0	9,8	4,0	0,4	0,0	0,0	58,0	10,7	4,0	0,6	501,0
2018	GT: Infectados com T. gondii (Amostra RH)	7,4	11,5	34,0	46,0	16,0	34,0	9,7	0,0	0,0	27,0	2,6	4,0	0,4	0,0	0,0	66,0	6,4	3,0	0,3	276,0
1008		7,7	11,7	35,0	45,0	15,0	33,0	9,8	0,0	0,0	30,0	2,9	2,0	0,2	0,0	0,0	66,0	6,5	2,0	0,2	474,0
3428		7,6	11,8	35,0	46,0	16,0	34,0	11,0	0,0	0,0	30,0	3,3	3,0	0,3	0,0	0,0	64,0	7,0	3,0	0,4	298,0
813		6,9	10,3	31,0	45,0	15,0	33,0	8,4	0,0	0,0	43,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	55,0	4,6	2,0	0,2	486,0
1108		7,0	10,6	32,0	46,0	15,0	33,0	18,0	0,0	0,0	48,0	8,6	2,0	0,4	0,0	0,0	47,0	8,5	3,0	0,5	414,0
	Média	7,3	11,2	33,4	45,6	15,4	33,4	11,4	0,0	0,0	35,6	4,2	2,2	0,2	0,0	0,0	59,6	6,6	2,6	0,3	389,6
	Desvio	0,4	0,7	1,8	0,5	0,5	0,5	3,8	0,0	0,0	9,3	2,5	1,5	0,2	0,0	0,0	8,4	1,4	0,5	0,1	97,9
	Mínimo	6,9	10,3	31,0	45,0	15,0	33,0	8,4	0,0	0,0	27,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	47,0	4,6	2,0	0,2	276,0
	Máximo	7,7	11,8	35,0	46,0	16,0	34,0	18,0	0,0	0,0	48,0	8,6	4,0	0,4	0,0	0,0	66,0	8,5	3,0	0,5	486,0