UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

TRANSMISSÃO SEXUAL DO *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) EM CAPRINOS (*Capra hircus*)

Luís Fernando Santana
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

TRANSMISSÃO SEXUAL DO *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) EM CAPRINOS (*Capra hircus*)

Luís Fernando Santana

Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

Santana, Luís Fernando
S231t Transmissão sexual do Toxoplasma gondii (Nicolle & Manceaux, 1909) em caprinos (Capra hircus) / Luís Fernando Santana. – – Jaboticabal, 2011
xv, 121 f. : Il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Alvimar José da Costa
Banca examinadora: Odilon Vidotto, Carlos Noriyuki Kaneto, Flávio Ruas de Moraes, Paulo Henrique Franceschini
Bibliografia

1. Monta natural. 2. Caprinos. 3. Toxoplasmose. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.3:561.24

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUIS FERNANDO SANTANA – nasceu em 24 de Julho de 1979, na cidade de Uberaba – MG, filho de João Batista Filho e Maria Abadia Arduini Santana. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista – campus de Jaboticabal, em dezembro de 2003. Obteve título de mestre por esta mesma instituição em 27 de Fevereiro de 2009. Atualmente é professor efetivo do ensino básico, técnico e tecnológico do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro – Campus Uberaba, MG.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo incansável incentivo e apoio à minha realização profissional. A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por sempre me conduzir pelo caminho certo e por ter colocado no meu caminho as pessoas que colocou.
- Ao Prof. Alvimar José da Costa, por todos estes longos anos de orientação, conselhos e ensinamentos. Ao Senhor, minha eterna gratidão.
- Ao Prof. Gilson pela atenção, companheirismo, serenidade e invejável paciência em me atender quando preciso.
- A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio à pesquisa, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao CPPAR, na pessoa do seu supervisor, Prof. Alvimar José da Costa, por ter propiciado condições adequadas para o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos meus irmãos Fábio e Taciane pelo incentivo moral ao longo de todas nossas vidas.
- Aos amigos Ana Lúcia, Welber, Rafael, Tais, Cláudio, Carol e Helenara pela amizade e ajuda prestada ao longo destes anos.
- Aos amigos Roberta Cordeiro e Gabriel Rossi grandes responsáveis por esta pesquisa.
- A pós graduanda Márcia Jusi, sob supervisão da Profa. Rosangela Zacarias Machado, pela execução das etapas laboratoriais realizadas no Departamento de Patologia Veterináira.
- Ao pós graduando Fernando Augusto de Souza pela avaliações estatísticas aqui apresentadas
- A todos aqueles que contribuíram para o sucesso desta pesquisa

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....vi

LISTA DE FIGURAS.....x

LISTA DE FIGURAS EM ANEXO.....xii

RESUMO.....1

SUMMARY.....3

1. INTRODUÇÃO.....5

1.1 Aspectos Gerais.....5

1.2 Toxoplasmose em pequenos ruminantes.....9

2. OBJETIVOS.....12

3. MATERIAL E MÉTODOS.....13

3.1 Cepa de *Toxoplasma gondii*.....13

3.2 Obtenção de oocistos de *Toxoplasma gondii*.....13

3.3 Obtenção de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.....14

3.4 Seleção e inoculação dos caprinos reprodutores experimentais.....15

3.5 Exames realizados nos caprinos reprodutores experimentalmente infectados.....17

3.5.1 Exames clínicos.....17

3.5.2 Resposta Imune-humoral.....17

3.5.3 Exames no sistema reprodutor dos caprinos infectados experimentalmente.....19

3.5.3.1 Colheita do sêmen.....19

3.5.3.2 Pesquisa do Toxoplasma gondii no sêmen dos caprinos pelo bioensaio em camundongos.....20

3.5.3.3 Pesquisa do DNA de *T. gondii* pela PCR nas amostras seminais colhidas 21

A) Extração do DNA das amostras do controle positivo.....21

B) Reação em cadeia da polimerase (PCR).....22

C) Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados na PCR.....22

3.5.3.4 Pesquisa do *Toxoplasma gondii* nos testículos, epidídimos, vesículas seminais e próstatas dos caprinos reprodutores infectados experimentalmente.....23

A) Imunohistoquímica.....23

B) Bioensaio em camundongos.....24

C) Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* pela PCR nas amostras teciduais colhidas dos machos experimentais 26

3.6 Seleção das fêmeas reprodutoras para a realização da monta natural.....26

3.6.1 Determinação dos dias pós-inoculação em que os reprodutores experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii* realizaram a monta natural nas fêmeas soronegativas.....27

3.6.2 Programa de sincronização de cio utilizado nas fêmeas reprodutoras.....28

3.7 Exames realizados nas fêmeas reprodutoras.....29

3.7.1 Exames clínicos.....29

3.7.2 Determinação da parasitemia 29

3.7.3 Resposta imune humoral (ELISA-teste).....30

A) Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado.....31

B) Soros de referência positivo e negativo.....31

C) Reação de ensaio imunoenzimático (ELISA- teste) 31

D) Avaliação dos valores de absorbância dos soros testados.....32

3.7.4 Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos das fêmeas experimentais e em seus “produtos”.....33

3.8 Análise estatística.....33

4- RESULTADOS.....34

4.1 Obtenção de cistos cerebrais contendo bradizoítos de *T.gondii*.....35

4.2 Obtenção de oocistos de *T.gondii*.....34

4.3 Obtenção de taquizoítos de *T. gondii*.....35

4.4 Seleção e inoculação dos caprinos reprodutores experimentais. 35

4.5 Exames realizados nos caprinos reprodutores experimentalmente infectados.....36

4.5.1 Exames clínicos.....36

4.5.2 Resposta Imune Humoral (RIFI).....41

4.5.3 Exames no sistema reprodutor dos caprinos infectados experimentalmente.....44

4.5.3.1 Colheita do sêmen.....44

4.5.3.2 Avaliação espermática.....44

4.5.4 Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos caprinos pelo bioensaio em camundongos.....50

4.5.5 Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* pela PCR nas amostras seminais 52

4.5.6 Pesquisa do *Toxoplasma gondii* nos testículos, epidídimos, vesículas seminais e próstatas dos caprinos reprodutores infectados experimentalmente.....54

4.5.6.1 Imunohistoquímica.....54

4.5.6.2 Bioensaio em camundongo.....55

4.5.6.3 Detecção de *Toxoplasma gondii* pela PCR. 56

4.6 Seleção das fêmeas reprodutoras para a realização da monta natural.....56

4.7 Exames realizados nas fêmeas reprodutoras.....57

4.7.1 Exames clínicos.....57

4.7.2 Ocorrências clínicas.....69

4.7.3 Determinação da Parasitemia.....69

4.7.4 Resposta imune humoral (ELISA - teste).....72

4.7.5 Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos das fêmeas e em seus produtos.....74

4.7.5.1 Imunohistoquímica.....74

4.7.5.2 Bioensaio em camundongo.....75

4.7.5.3 Pesquisa do DNA de *T. gondii* pela PCR.....77

5.- DISCUSSÃO.....79

5.1 Obtenção de oocistos e seleção dos caprinos.....79

5.2. Machos experimentais.....80

5.3. Fêmeas experimentais e filhotes.....89

6 – CONCLUSÕES 97

7 - REFERÊNCIAS.....98

ANEXOS 117

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Delineamento experimental dos caprinos reprodutores submetidos à infecção toxoplásmica.....16

Tabela 2. Temperaturas retais individuais aferidas nos caprinos machos experimentais antes e após a inoculação de *Toxoplasma gondii*.....37

Tabela 3. Freqüências cardíacas individuais, em batimentos por minuto (bpm), mensurada nos caprinos machos experimentais antes e após inoculação de *Toxoplasma gondii*.....37

Tabela 4. Freqüência respiratória individuais, em movimentos por minuto (mpm), aferidas nos caprinos machos antes e após inoculação de *Toxoplasma gondii*....37

Tabela 5. Médias e desvio padrões dos parâmetros clínicos observados nos períodos pré e pós-inocualção de caprinos não inoculado (C - Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) ou com 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii*.....41

Tabela 6. Recíproca dos títulos sorológicos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) dos caprinos machos não inoculado (C - Controle) e inoculados experimentalmente com 2x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii*.....43

Tabela 7. Parâmetros seminais de caprinos machos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii*.....45

Tabela 8. Resultados das análises paramétricas e não paramétricas dos parâmetros seminais nos períodos pré e pós-inocualção de caprinos não inoculado (C - Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondi*.....50

Tabela 9. Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em ejaculados de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) identificados por meio do bioensaio em camundongos.....51

Tabela 10. Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* em ejaculados de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B), identificados por meio da eletroforese do material genético amplificados na PCR.....53

Tabela 11. Pesquisa de *Toxoplasma gondiii,* nos tecidos do sistema reprodutor dos caprinos machos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *T. gondii* por meio da imunohistoquímica.....54

Tabela 12. Pesquisa de *Toxoplasma gondiii,* nos tecidos do sistema reprodutor dos caprinos machos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *T. gondii* por meio do bioensaio em camundongos.....55

Tabela 13. Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondiii,* no sistema reprodutor de caprinos experimentais não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *T. gondii* por meio da eletroforese do material genético amplificados na PCR.....56

Tabela 14. Temperaturas retais aferidas em fêmeas experimentais durante os períodos pré e pós-cobertura (monta natural).....58

Tabela 15. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro temperatura retal (ºC) de cabras cobertas naturalmente por reprodutor não inoculado (GIII–Controle) e inoculados experimentalmente com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii*.....60

Tabela 16. Freqüências cardíacas aferidas em fêmeas experimentais nos períodos pré e pós cobertura.....62

Tabela 17. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro freqüência cardíaca (bpm) de cabras cobertas naturalmente por reprodutor não inoculado (GIII – Controle) e inoculados experimentalmente com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii*.....64

Tabela 18. Freqüências respiratórias aferidas em cabras experimentais durante os períodos pré e pós cobertura.....66

Tabela 19. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro freqüência respiratória (mpm) de cabras cobertas naturalmente por reprodutor não inoculado (GIII – Controle) e

inoculados experimentalmente com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii*.....68

Tabela 20. Surtos parasitêmicos em fêmeas caprinas cobertas por machos inoculados com *Toxoplasma gondii* e não inoculado (Controle).....71

Tabela 21. Valores de densidade óptica (DO) e resultados (+/-), obtidos por meio da técnica do Elisa Indireto em soros de cabras cobertas pelos machos inoculados com *Toxoplasma gondii* e não inoculado (Controle).....73

Tabela 22: Identificação de *Toxoplasma gondii* por meio da imunomarcação, em tecidos reprodutivos das fêmeas caprinas, utilizando o método da imunohistoquímica.....75

Tabela 23. Presença de *Toxoplasma gondii* nos tecidos reprodutivos das fêmeas caprinas e dos respectivos “produtos” da gestação, diagnosticado por meio do bioensaio em camundongo.....76

Tabela 24. Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* nos tecidos reprodutivos das fêmeas caprinas cobertas pelos machos reprodutores em seus respectivos “produtos” gestacionais, por meio da PCR.....78

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Temperaturas retais individuais aferidas do caprino macho não inoculado (C - Controle) e dos caprinos machos inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii,* nos períodos pré e pós inoculação.....38

Figura 2. Freqüências cardíacas individuais, em batimentos por minuto (bpm), aferidas do caprino macho não inoculado (C - Controle) e dos caprinos machos inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e com 1 x 10^6 taquizoítos(B) de *Toxoplasma gondii,* nos períodos pré e pós inoculação.....39

Figura 3. Freqüências respiratórias individuais, em movimentos por minuto (mpm), aferidas do caprino macho não inoculado (C - Controle) e dos caprinos machos inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii,* nos períodos pré e pós inoculação. 40

Figura 4. Volume espermático (mL) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii* nos períodos pré e pós inoculação.....46

Figura 5. Motilidade espermática (%) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii*.....47

Figura 6. Vigor espermático (0 - 5) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii*.....48

Figura 7. Alterações patológicas espermáticas (%) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii*.....49

Figura 8. Concentração espermática (x 10^8 espermatozóides/mL) de caprinos não inoculado (C – Controle), inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii*.....49

Figura 8. Concentração espermática (x 10^8 espermatozóides/mL) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii*.....40

Figura 9: Temperaturas retais médias aferidas das cabras experimentais cobertas naturalmente por reprodutor não inoculado (GIII – Controle) e inoculados experimentalmente com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii*.....59

Figura 10: Freqüências cardíacas médias aferidas em cabras cobertas naturalmente por reprodutores não inoculado (GIII – Controle) e inoculados com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii*.....63

Figura 11: Freqüências respiratórias médias aferidas em cabras experimentais cobertas naturalmente por reprodutores não inoculado (GIII – Controle) e inoculados experimentalmente com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii*.....67

LISTA DE FIGURAS EM ANEXO **Página**

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (100 pb) ; Tecidos da Cabra 1013 (02 – M. Cardíaca; 03–Cérebro; 04–M. Esquelética; 05–Útero; 06–Ovário; 07– Vagina; 08–Fígado; 09–Baço); Tecidos da Cabra 1040 (10–Ùtero; 11– M. Esquelética; 12–Vagina; 13–Cérebro; 14–Ovário; 15–M Cardíaca; 16–Fígado; 17–Baço); 18– controle negativo; 19–controle positivo.....117

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03– Controle negativo; Tecidos da Cabra 1088 (04–Útero; 05–Ovário, 06–M, Cardíaca; 07–M. Esquelética; 08–Cérebro; 09–Fígado; 10–Vagina; 11–Baço); 12–vazio.....117

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; Tecidos da Cabra 1003 (03–M Cardíaca; 04–Fígado; 05–M Esquelética; 06–Útero; 07–Ovário; 08–Cérebro; 09–Baço; 10–Vagina); Tecidos da Cabra 1048 (11–Vagina; 12–Fígado; 13–Ovário; 14–Baço; 15–Útero; 16–Cérebro; 17–M Cardíaca; 18–M Esquelética); 19–controle negativo.....117

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03–Controle negativo; Tecidos da Cabra 1032 (04–Fígado; 05–M Esquelética; 06–Útero; 07–M Cardíaca; 08–Cérebro; 09–Ovário; 10–Baço; 11–Vagina); 12–vazio.....117

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; Tecidos da Cabra 1077 (03–Útero; 04–M Cardíaca; 05–M Esquelética; 06–Fígado; 07–Cérebro); Tecidos da Cabra 1031 (08–Cérebro; 09–Ovário; 10–M Cardíaca; 11–Útero; 12–Vagina; 13–Fígado; 14–M Esquelética; 15–Baço); Tecidos da Cabra 1055 (16–M Cardíaca; 17–Cérebro; 18– Fígado); 19–controle negativo.....118

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01– Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03– Controle negativo; Tecidos da Cabra 1055 (04–M Esquelética; 05–Útero + Placenta; 06– Baço; 07–Vagina); Tecidos do Cabrito da Cabra 1064 (08–M Cardíaca; 09–Fígado; 10–Cérebro; 11–Baço); 12–Vazio.....118

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03– controle negativo; Tecidos da Cabra 1064 (04–Cérebro; 05–M Cardíaca; 06–M Esquelética; 07–Fígado; 08–Vagina; 09–Útero; 10–Baço); Tecidos do caprino macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (11–Vesícula Seminal; 12– Testículo; 13–Próstata; 14–Epidídimo) Tecidos do caprino macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* (15–Testículo; 16–Epidídimo; 17–Próstata; 18–Vesícula Seminal); 19–Vazio.....118

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03–Controle negativo; Tecidos do Cabrito da Cabra 1031 (04–Cérebro; 05–M Cardíaca; 06–Fígado; 07–Baço); Tecido do Cabrito da Cabra 1055 (08–Cérebro; 09–Baço; 10–M Cardíaca; 11–Fígado); 12–vazio.....119

Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; 03– Controle negativo; Tecidos do Cabrito da Cabra 1077 (04– Fígado; 05–M Cardíaca; 06–Baço); Tecidos do aborto da Cabra 1003 (07–M Cardíaca; 08–Cérebro; 09–Fígado; 10–Placenta; 11–Baço); Tecidos do aborto da Cabra 1013 (12–M Cardíaca; 13–Baço; 14–Placenta; 15–Fígado); Amostras Seminais do macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* (16– 7DPI; 17 - 5DPI; 18– 3DPI; 19–1DPI).....119

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; 03– Controle negativo; Amostras seminais pós infecção do macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* (04–21DPI; 05– 14DPI; 06– 11DPI; 07–9DPI; 08–7DPI; 09– 49DPI; 10–42DPI; 11–35DPI; 12– 28DPI); 13– vazio 119

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; 03– controle negativo; Amostras seminais pós infecção do macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* (04–70DPI; 05– 63DPI; 06– 56DPI); Amostras seminais pós infecção do macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (07–21DPI; 08– 14DPI; 09–11DPI; 10–9DPI; 11–7DPI; 12– 5DPI; 13–3DPI; 14–1DPI; 15– 28DPI; 16– 56DPI; 17–49DPI; 18–35DPI; 19 Vazio).....119

Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; 03– Controle negativo; Amostras seminais pós infecção do macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (04–70DPI; 05– 63DPI; 06- 42 DPI); Tecidos do aborto da Cabra 1032 (07–M Cardíaca; 08– Fígado; 09–

Cérebro; 10– Baço; 11– Placenta); Amostra seminal pós infecção do macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (12- 7DPI) ;13 – vazio.....120

Figura 24. Cabra 1012 e os produtos da gestação decorrentes da cobertura por macho não inoculado (Controle).....120

Figura 25. Aborto aos 100 dias de gestação da Cabra 1032 coberta naturalmente pelo macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.....120

Figura 26. A) Fotomicrografia do cérebro da cabra 1048. Seta mostrando Imunodetecção de *Toxoplasma gondii.* B) Fotomicrografia de musculatura esquelética da cabra 1064. Seta mostrando Imunodetecção de *Toxoplasma gondii* Complexo de polímero ligado a peroxidase (Objetiva de 40x).....121

Figura 27. A) Fotomicrografia do fígado da cabra 1003. Seta mostrando Imunodetecção de *Toxoplasma gondii.* B) Fotomicrografia de musculatura esquelética da cabra 1040. Seta mostrando Imunodetecção de *Toxoplasma gondii* Complexo de polímero ligado a peroxidase (Objetiva de 40x).....121

TRANSMISSÃO SEXUAL DO *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) EM CAPRINOS (*Capra hircus*)

RESUMO - Caprinos machos em idade reprodutiva, sorologicamente negativos para *Toxoplasma gondii*, foram selecionados e distribuídos como apresentado a seguir: A - um caprino inoculado, via oral, com 2,0 x 10^5 oocistos da cepa P; B - um caprino inoculado, via subcutânea, com 1,0 x 10^6 taquizoítos da cepa RH e C - um caprino não inoculado mantido como controle. Após a inoculação dos machos com *T. gondii*, 12 cabras reprodutoras, não gestantes, sorologicamente negativas para as principais doenças reprodutivas, sobretudo toxoplasmose, foram sincronizadas. Em seguida, foram expostas à monta natural pelos machos, anteriormente inoculados: cinco cabras submetidas à monta natural pelo macho A (GI); cinco cabras submetidas à monta natural pelo macho B (GII) e duas cabras pelo macho C – controle (GIII). Nos soros das cabras obtidos nos dias -14, -7, -1 (antes da monta natural), e nos dias 3, 6, 9, 11, 14 e semanalmente até o parto, foi pesquisada a presença de anticorpos contra *T. gondii* pelo ELISA teste. Bioensaio em camundongos e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizados em amostras de sêmen e tecidos dos machos, tecidos das fêmeas e de seus respectivos “produtos”. Dez das 12 fêmeas utilizadas apresentaram anticorpos específicos contra *T. gondii* após a monta natural, sendo as cinco cobertas pelo macho inoculado com oocistos (GI) e cinco cobertas pelo caprino inoculado com taquizoítos (GII). Pelo bioensaio e pela PCR

foi possível identificar, em várias datas experimentais em que ocorreu a monta natural, a presença do *T. gondii* nas amostras seminais dos caprinos inoculados. Posteriormente, após eutanásia, foi possível também isolar este parasito em algumas das amostras teciduais dos machos experimentais. Por estas mesmas técnicas de diagnóstico, identificou-se também a presença deste coccídio nas amostras teciduais das fêmeas experimentais, assim como de seus “produtos” oriundos das montas naturais, tais como fetos viáveis, prematuros ou abortos. Nos machos inoculados com o referido protozoário, assim como nas fêmeas naturalmente cobertas por estes reprodutores, não foi possível identificar qualquer alteração clínica sugestiva de parasitismo toxoplásmico. Portanto, pelos resultados obtidos comprovou-se , pela primeira vez, a transmissão sexual da toxoplasmose na espécie caprina.

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

SEXUAL TRANSMISSION OF *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) IN GOATS (*Capra hircus*)

SUMMARY - Male goats in reproductive age, serologically negative for *Toxoplasma gondii,* were selected and distributed according to the following arrangement: A - one goat inoculated orally with 2.0 x 10^5 oocysts of the strain P; B - one goat inoculated subcutaneously with 1.0 x 10^6 tachyzoites of the strain RH and C - one uninfected goat kept as control. After *T. gondii* inoculation, 12 non-pregnant female breeder goats serologically negative for the main reproductive diseases, especially toxoplasmosis, were synchronized and then exposed to natural mating by those males previously inoculated, being: five females submitted to natural mating by the male A (GI), five females exposed to natural mating by the male B (GII) and two females submitted to natural mating by the uninfected male (GIII). In sera obtained from all female goats on days -14, -7, -1, (before natural mating) and on days 3, 6, 9, 11, 14 and weekly until partum, the presence of antibodies against *T. gondii* was investigated by ELISA test. Bioassay in mice and PCR were performed on samples of semen and tissues of males and females and on their products which were stillbirths, fetus and offspring. Ten out of 12 females used showed specific antibodies against *T. gondii* after natural mating, being five from group GI and five from group GII. On several dates in which natural mating occurred, *T. gondii* was identified in semen samples of infected males by bioassay and PCR. Subsequently, after euthanasia, it was possible to isolate *T. gondii* in

some of tissue samples from experimentally infected males. Moreover, by PCR and bioassay techniques it was also possible to identify *T. gondii* in tissue samples from experimentally infected females as well as their products (stillbirths, fetus and offspring). It was not possible to notice any clinical signs of toxoplasmosis. Therefore, these results proved, for the first time, the sexual transmission of toxoplasmosis in goat species.

keywords: Natural mating, goats, sexual transmission, toxoplasmosis

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Aspectos Gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário de ciclo de vida facultativamente heteroxeno e capaz de infectar todas as espécies de animais homeotérmicos, incluindo mamíferos, aves e o homem. É uma zoonose de caráter cosmopolita, tendo importância veterinária e médica, sendo responsável por abortos e doença congênita em várias espécies de hospedeiros intermediários (TENTER *et al*, 2000).

As principais vias de transmissão do *T. gondii* são: infecção transplacentária (taquizoítos circulantes) sendo mais freqüente no terço final da gestação (DUBEY e TOWLE, 1986; MAMIDI *et al*., 2002), ingestão de água como sugerem os trabalhos de ARAMINI *et al*. (1998) e ARAMINI *et al*.(1999) e 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).

Embora menos freqüente, a infecção pode acontecer por meio de acidentes laboratoriais (WONG e REMINGTON, 1993), transfusão sangüínea (FIGUEROA-DAMIAN, 1998), transplante de órgãos (MUNIR *et al*., 2000), e ingestão de leite não pasteurizado (CHIARI *et al.,*1984; RIEMANN *et al.*, 1975; SACKS *et al.*, 1982). Estudos recentes realizados por LIU *et al*., (2009) evidenciam também grande risco de infecção em mulheres gestantes, que no ato de prepararem os alimentos, experimentam o tempero de carnes cruas.

Em crianças lactentes, embora não se tenha comprovado a transmissão por meio da amamentação, BONAMETTI *et al*. (1997) descreveram um caso de

toxoplasmose em uma criança cuja dieta era constituída exclusivamente por leite materno. A mãe fazia parte de um grupo de 17 indivíduos que haviam adquirido toxoplasmose pela ingestão de carne ovina crua. Um inquérito sorológico na propriedade de origem de tais ovinos, revelou que 43% dos animais eram soropositivos para toxoplasmose.

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

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

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

Com o avanço da infecção, o hospedeiro começa a desenvolver uma resposta imune que atua sobre a multiplicação dos taquizoítos, os quais passam a se dividir mais lentamente, sendo então denominados bradizoítos e que se encontram confinados num cisto no interior das células parasitadas, protegidos contra a ação do sistema imune e de drogas. É a infecção latente ou crônica, que pode se perpetuar por vários anos (SWANGO *et al*., 1989).

Segundo RUSSEL *et al*. (2002) e DARDE (2004), existe a possibilidade também, 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.

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

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

Segundo JACOBS (1957): “o homem vive num mar de infecção toxoplásmica”. De fato, esta parasitose é considerada a zoonose mais disseminada na natureza (JACOBS, 1973; HIRT, 1976). O avanço nas técnicas de diagnóstico, associados a um conhecimento mais racional por parte dos clínicos e patologistas, tem evidenciado a vasta distribuição e ocorrência da toxoplasmose tanto humana como animal (ISHIZUKA, 1974). A toxoplasmose apresenta uma extensa variedade de manifestações patológicas, assumindo, ainda, uma gama de aspectos clínicos, fazendo com que pacientes acometidos sejam vistos em consultórios e enfermarias de quase todas as especialidades médicas.

Estima-se que um terço, ou mais, da população humana possua anticorpos contra o *Toxoplasma gondii* (MONTOYA; LESENFELD, 2004). Em trabalhadores rurais ligados ao manejo de caprinos, a prevalência desta zoonose pode alcançar 61% de humanos infectados, indicando grandes chances de infecção em virtude de medidas sanitárias inadequadas (ISHAG *et al*., 2008).

Em pacientes aidéticos, a toxoplasmose manifesta-se com uma elevada freqüência, sendo considerada uma doença oportunista (LUTF e REMINGTON, 1988) que provoca a reativação dos cistos, principalmente os cerebrais, produzindo grave encefalite (HALONEN *et al.,* 2001; KHETSURIANI *et al*., 2002; CASTRO-SANSORES, *et al*., 2004; PRADHAN *et al*., 2007)). POTASMAN *et al*. (1987) observaram uma freqüência de encefalite *por T. gondii* entre seis e 10% de pacientes aidéticos nos EUA.

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 caprinocultura mostra-se como um dos sistemas de criação que muito se desenvolveu nos últimos tempos, 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 caprina torna-se de suma importância.

1.2 - Toxoplasmose em pequenos ruminantes

A toxoplasmose animal é uma doença parasitária de elevada importância veterinária, zootécnica e de saúde pública, uma vez que acarreta prejuízos aos animais de produção e de estimação (O'ROUKE, 2002), além de servirem de fonte direta ou indireta de infecção para o ser humano (LINDSAY *et al*., 1997; GARCIA *et al*., 1999; JITTAPALAPONGA *et al*., 2005).

Os suínos, ovinos, caprinos e coelhos são mais comumente infectados com *T. gondii,* quando comparados a bovinos e eqüinos (DUBEY & HAMIR, 2002). A carne suína é considerada a principal fonte de infecção para humanos nos Estados Unidos e, provavelmente, em vários outros países (GAMBLE, 1997)**.** No entanto, em virtude das intensas modificações ocorridas na suinocultura industrial moderna, principalmente no que se refere à criação dos suínos em ambientes fechados, que não permitem o acesso de felinos disseminando oocistos, pode-se notar uma severa queda na soroprevalência destes animais, paralelamente ao declínio desta zoonose em humanos (JONES *et al*., 2007).

Estudos recentes realizados por RAGOZO *et al* (2010), no estado de São Paulo e Rio Grande do Norte, revelam uma alta diversidade genética dos isolados de *T. gondii* de pequenos ruminantes no Brasil. Desta forma, as taxas de infecção

apontadas para rebanhos caprinos e ovinos são variáveis. Esta flutuação deve-se principalmente ao tipo de teste sorológico utilizado, à região e a idade dos animais estudados (DUBEY, 1990; KAMANI *et al*., 2010), assim como o número de amostras pesquisadas, o sistema de manejo, as condições de criação, a localização das propriedades e as práticas sanitárias adotadas nos rebanhos (CARNEIRO *et al*., 2009; KAMANI *et al*., 2010). Segundo IVANA *et al* (2006) as maiores prevalências de toxoplasmose nas espécies domésticas esta ligada a localização das propriedades em climas quentes e úmidos. Em Minas Gerais, MACHADO & LIMA (1987) encontraram 36,80% de caprinos positivos em 46 propriedades estudadas, com taxas de 36,10% em rebanhos leiteiros e 11,40% nos animais de corte. CARNEIRO *et al*. (2009), pesquisando 767 soros caprinos no mesmo estado brasileiro encontraram uma prevalência de 45,80% e 42,80% através dos métodos de RIFI e ELISA respectivamente. GONDIM *et al*. (1999) detectaram 18,75% e 28,93% de ovinos e caprinos, respectivamente, positivos ao teste de aglutinação ao látex, em pesquisa realizada no estado da Bahia. FARIA *et al*. (2007) encontraram prevalência de 24,50% em caprinos abatidos em um frigorífico na cidade de Patos no estado da Paraíba.

No estado de São Paulo, MAINARDI *et al* (2003) encontraram taxa de 14,50% de animais sorologicamente positivos em sete diferentes regiões criadoras de caprinos leiteiros e, em um levantamento mais recente feito por FIGLIUOLO *et al* (2004), no mesmo estado, foi observado que a prevalência de toxoplasmose em 19 fazendas atingia a 28,70% dos soros dos caprinos testados. Em outras regiões do território nacional, pode se observar prevalência ainda maior da doença, como,

por exemplo, no estado do Pernambuco onde foi encontrado índice de até 40,40% em caprinos, oriundos de propriedades localizadas na Zona da Mata e Agreste, testados pela reação de imunofluorescência indireta (SILVA *et al*, 2003). No Rio Grande do Norte, NETO *et al*. (2008), por meio da mesma técnica sorológica, examinaram 366 soros caprinos, encontrando uma prevalência de 30,60%.

MUNDAY & MASON (1979) foram os primeiros a descreverem a toxoplasmose como importante causa de prejuízos reprodutivos em caprino, acometendo clinicamente tanto animais jovens, como os adultos (DUBEY, 1987).

A toxoplasmose é apontada como a segunda causa de abortos em caprinos na França (CHARTIER & MALLEREAU, 2001 e na Suíça CHANTON *et al*., 2002). Desordens reprodutivas, como abortos e neonatos mortos ou fracos, que evoluem para óbito, geram perdas econômicas consideráveis em rebanhos suínos (VIDOTTO & COSTA, 1987). No Brasil, abortos sem diagnóstico definitivo têm sido observados em caprinos de diferentes estados da região nordeste, onde a caprinocultura tem uma imensa importância econômica (PINHEIRO *et al*., 2000; SILVA *et al*., 2005; BANDEIRA *et al*., 2007), sendo, portanto, de extrema relevância a atenção dada a fatores de risco, para a infecção do rebanho como: a idade dos caprinos, número de gatos na propriedade, presença ou ausência de comedouros manufaturados, conforme citado por CAVALCANTE *et al*. (2008).

DUBEY *et al.*(1980) relatam que os resultados referentes às infecções experimentais com oocistos de *T. gondii*, por via oral em cabras gestantes, variam de acordo com o estágio da prenhez e com o período de inoculação com o parasita.

Embora em ovinos (SPENCE *et al*., 1978; TEALE *et al*., 1982; AGANGA *et al*,1988, LOPES *et al*., 2006), caprinos (DUBEY e SHARMA, 1980, SANTANA *et al*, 2010), bovinos (SCARPELLI, 2001) e suínos (MOURA, 2004), o isolamento do *T. gondii* no sêmen destes animais tenha sido realizado com sucesso, inexiste na literatura consultada, trabalhos que comprovam a viabilidade da transmissão sexual deste coccídio na espécie caprina, seja por meio de inseminação artificial com sêmen contendo *T. gondii* ou montas naturais com machos portadores deste protozoário no sêmen.

2. OBJETIVOS

Geral:

Estudar a viabilidade da transmissão sexual de *T. gondii* em fêmeas caprinas, sorologicamente negativas para toxoplasmose, cobertas naturalmente por machos infectados experimentalmente com oocistos ou taquizoítos do referido protozoário.

Específicos - Machos

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

Pesquisar pelas técnicas da bioprova e da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a presença de *T. gondii* em amostras seminais colhidas dos caprinos machos infectados experimentalmente.

Específicos - Fêmeas

Avaliar a possível infecção por *T. gondii,* clínica e laboratorialmente, de fêmeas caprinas em idade reprodutiva.

Pesquisar por meio do Ensaio Imunoenzimático (ELISA-teste) a resposta imune-humoral das fêmeas pós-cobertura.

Investigar a possível presença de *T. gondii* em diversos tecidos das reprodutoras cobertas naturalmente e em seus produtos, por meio da bioprova e da PCR.

Após a interpretação dos resultados obtidos dos machos e fêmeas, elucidar a possível ocorrência da transmissão sexual do *T. gondii* na espécie caprina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Cepa de *Toxoplasma gondii*

Foram utilizadas as cepas “P” e ”RH”, obtidas junto ao CPPAR/UNESP – Jaboticabal. A cepa “P” (JAMRA; VIEIRA, 1991), genotipicamente caracterizada e classificada como do Tipo III (BRESCIANI *et al*., 2009) é capaz de produzir infecções letais, em condições de laboratório, nos camundongos experimentais. Os sobreviventes à infecção normalmente apresentam razoável quantidade de cistos teciduais no cérebro. Os oocistos desta cepa mostram-se infectantes para camundongos (VIDOTTO *et al*., 1986) mesmo depois de mantidos durante cinco anos em temperatura de refrigeração (4°C a 8°C). Segundo PENA *et al* (2008) e HERRMANN *et al* (2010) a cepa “RH” (SABIN, 1941), é capaz também de produzir

infecções letais em camundongos experimentais, sendo classificada genotipicamente como Tipo I.

3.2 – Obtenção de oocistos de *Toxoplasma gondii*

Os oocistos de *Toxoplasma gondii* foram obtidos de forma semelhante à técnica descrita por COSTA *et al*. (1977). Colheitas diárias de fezes foram realizadas, em gatos experimentalmente infectados, durante 15 dias pós-infecção, por meio de exames coproparasitológicos (Método de Sheater). As fezes colhidas foram misturadas com água até a formação de uma massa pastosa. Solução de sacarose (500g de açúcar dissolvidas em 320mL de água destilada) foi adicionada na proporção 1:1 para homogeneização do material. Em seguida, este material foi filtrado para a remoção das partículas maiores e transferido para tubos cônicos de centrífuga de 50mL (Falcon). O material, assim obtido, foi centrifugado (3000 a 4000 rpm por 10 minutos) e com o auxílio de pipeta Pasteur foram aspiradas alíquotas do sobrenadante para a pesquisa de oocistos de *T. gondii* em microscópio de luz (objetiva de 40X). Aos oocistos, assim obtidos, foi adicionada solução de ácido sulfúrico a 2% para auxiliar na esporulação. O material foi mantido em temperatura ambiente, parcialmente fechado e aerado mecanicamente por duas vezes, diariamente, durante três a sete dias, até completa esporulação. Os oocistos esporulados foram lavados em solução fisiológica, por meio de sucessivas centrifugações, para remoção do ácido sulfúrico 2% e estocados em temperatura de refrigeração (4^oC a 8^oC) imersos em solução salina.

A identificação dos oocistos esporulados foi feita utilizando-se critérios morfológicos (ZAMAN, 1970), medidas (10 a 12 micrômetros) em régua micrométrica ocular calibrada para a objetiva de aumento 40X do microscópio de luz e inoculações intraperitoneais (2500 oocistos/animal) em camundongos (DUBEY *et al*., 1972). Após a identificação, foi feita a quantificação total dos oocistos utilizando-se câmara de Newbauer.

3.3 – Obtenção de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Os taquizoítos da cepa RH, mantidos em camundongos, foram administrados (1 x 10^6) a um caprino macho, pela via subcutânea. O inoculo foi padronizado conforme técnica descrita por BRESCIANI (2003).

3.4 – Seleção e inoculação dos caprinos machos reprodutores experimentais

Exames sorológicos para a detecção de anticorpos contra doenças infecciosas que possam provocar desordens reprodutivas (brucelose, leptospirose, toxoplasmose e neosporose) foram realizados previamente para a seleção dos três machos reprodutores, adquiridos junto ao setor de caprinos da FCAV/UNESP-Jaboticabal. Para brucelose foi empregada a Técnica do Antígeno Acidificada Tamponado, também conhecida como Teste do Rosa Bengala ou “Card Test” (ALTON *et al*., 1988). Para este teste, 0,03 mL do soro foram colocados em contato com 0,03 mL do antígeno, em placa de vidro própria. Em seguida, após homogeneizada a mistura, a placa foi mantida em movimentos rotatórios durante

quatro minutos para observar a ocorrência, ou não, de grumos de aglutinação, indicativos da soroconversão.

Para a pesquisa de leptospirose adotou-se a técnica de Soroaglutinação Microscópica. Os soros foram testados contra os sorovares *pomona, icterohaemorrhagiae* e *hardjo*. O critério adotado para considerar um soro reagente foi de 50% de aglutinação no título final de 1:100, ou seja, metade das leptospiras aglutinadas no campo microscópico, observado no aumento de 100X. Para a realização da técnica e interpretação do grau de aglutinação seguiu-se a metodologia adotada por COLE *et al.* (1973).

A técnica sorológica empregada na seleção dos animais experimentais para a pesquisa de anticorpos contra toxoplasmose e neosporose foi a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), de acordo com CAMARGO (1964). Considerou-se positivos soros com títulos a partir da diluição 1:64 e 1:50 para *T. gondii* e *Neospora. caninum*, respectivamente. Os animais selecionados foram sorteados e distribuídos em grupos experimentais conforme o delineamento contido na Tabela 1.

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

N° de caprinos	Oocistos de *Toxoplasma gondii*	Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*	Via de inoculação
1	$2x\ 10^5$	-	Oral
1	-	1×10^6	Subcutânea
1	Placebo		Oral

Os três machos reprodutores selecionados de um total de 10 animais da raça Saanen, de um a quatro anos de idade, foram mantidos em baias individuais no CPPAR (Centro de Pesquisas em Sanidade Animal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP, com água, silagem de milho e concentrado fornecidos *ad libitum.*

Um dos animais recebeu 2×10^5 oocistos de *T. gondii*, via oral, por meio de uma seringa acoplada a uma sonda de metal, depositando assim o inóculo diretamente no esôfago, após jejum prévio de 12 horas. Em seguida, 200mL de solução fisiológica, foram administrados ao animal, utilizando-se do mesmo instrumento, para remover possíveis oocistos que eventualmente estivessem aderidos à seringa e/ou sonda. Um segundo animal foi infectado com 1×10^6 taquizoítos, via subcutânea, utilizando-se seringa e agulha devidamente esterilizadas conforme descrito por BRESCIANI (2003). O terceiro macho reprodutor recebeu solução fisiológica, via oral, sendo mantido como controle.

As fezes do caprino inoculado com oocistos foram removidas e o ambiente tratado com desinfetante, diariamente, durante sete dias consecutivos, para a destruição dos oocistos eventualmente presentes nos dejetos.

3.5 – Exames realizados nos caprinos reprodutores experimentalmente infectados

3.5.1 – Exames clínicos

Exames clínicos (freqüências cardíaca e respiratória e temperatura retal) foram realizados nos caprinos machos um dia antes da inoculação e no 1°, 3°, 5°, 7°, 9°, 11°, 14°, 21°, 28°, 35°, 42°, 49°, 56°, 63° e 70° dias pós-inoculação (DPI).

3.5.2 – Resposta Imune-humoral

Nos soros de todos os caprinos reprodutores, obtidos de amostras de sangue colhidas nos dias -14, -1 (anteriores à inoculação), 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 pós-inoculação, foram pesquisados anticorpos contra *T. gondii* pela RIFI (CAMARGO, 1964).

A colheita de sangue foi feita em tubos de ensaio estéreis puncionando-se a veia jugular com agulha 40 x 16 mm. Foram colhidos aproximadamente 10 mL de sangue, sem anticoagulante, por animal. Este material foi processado para obtenção do soro, sendo centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. O soro foi retirado com auxilio de pipeta Pasteur estéril e acondicionado em microtubos previamente autoclavados, e mantidos sob congelamento (-20°C).

Para a realização da RIFI, foram utilizados como antígeno taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, obtidos de lavado intraperitoneal, com solução salina estéril

acrescida de heparina (25 L de heparina em 50mL de solução salina), de camundongos no segundo dia pós-infecção, inativados por formol a 0,5%, em estufa a 37°C, por 30 minutos. Após centrifugação (um minuto a 500 rpm) para sedimentar células do exsudato peritoneal, o sobrenadante recolhido foi novamente centrifugado (10 minutos a 1500 rpm) e o sobrenadante obtido, desprezado. O sedimento foi então ressuspenso em PBS e centrifugado mais uma vez. Após nova ressuspensão do sedimento, o mesmo foi avaliado (microscopia de luz, objetiva de 40X) quanto ao número de taquizoítos e então diluído em PBS até obter-se uma média de 20 a 30 taquizoítos por campo. Dez microlitros desta suspensão de taquizoítos foram então colocados em “poços” (impressos em lâminas de microscopia pela técnica de “Silk Screen”). As lâminas contendo o antígeno foram então mantidas à temperatura ambiente, “overnight”, cobertas para evitar contaminação por poeira, até secarem. Em seguida foram envoltas em papel alumínio e estocadas a 20°C negativos até sua utilização.

Os soros dos caprinos foram diluídos em PBS em múltiplos de 4 (1:64 até 1:4096). Dez microlitros de cada diluição de cada soro foram adicionados nos poços das lâminas contendo o antígeno. As lâminas assim preparadas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas a 37°C, por 40 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes em tampão PBS, 10 minutos cada vez, e colocadas para secarem seis minutos em estufa a 37°C. Posteriormente, adicionou-se o conjugado gamaglobulina anti-IgG total de caprino/ovino marcado com isotiocianato de fluoresceína e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida (37°C por 40 minutos) em estufa, lavadas duas vezes com tampão

PBS e uma vez com água bidestilada (10 minutos cada lavagem) para remoção do excesso de sais. Após a secagem definitiva das lâminas, glicerina tamponada foi adicionada às mesmas, sendo posteriormente recobertas com lamínulas e examinadas em microscópio de fluorescência (objetiva de 40X).

3.5.3 – Exames no sistema reprodutor

3.5.3.1 – Colheitas do sêmen

Durante aproximadamente dois meses os três caprinos foram periodicamente submetidos ao “condicionamento” para a colheita de sêmen com o uso do eletro-ejaculador.

Os ejaculados foram recolhidos em tubos graduados acoplados a funis plásticos previamente esterilizados. Estes foram mantidos a 37°C e, no momento da colheita, acoplados a um recipiente aquecido para evitar o choque térmico, que poderia ocasionar mortalidade dos espermatozóides.

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

Dos três caprinos experimentais foram obtidas amostras de ejaculados, nos dias -1, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 pós-inoculação para avaliação dos seguintes parâmetros espermáticos: volume, motilidade, vigor, concentração e alterações patológicas (PAULA *et al*., 2008).

Para avaliação da motilidade (expressa em % de espermatozóides que se movimentam em trajetória retilínea e para frente) e do vigor (intensidade com que esta motilidade é exercida), imediatamente após a colheita, uma alíquota do

sêmen (aproximadamente 10 L) foi colocada sobre lâmina e recoberta por lamínula (previamente aquecidas a 37ºC) e observada ao microscópio de luz (aumentos de 10 e 40X). Os dados foram expressos em porcentagem (motilidade), numa escala de 0 a 5 (vigor), e anotados em fichas próprias para posterior análise (PAULA *et al*., 2008).

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

Para a análise da morfologia espermática foram obtidas alíquotas de 50 l, diluídas em 1 mL de solução salina formol (0,9%), objetivando evidenciar possíveis alterações patológicas espermáticas. Esta análise foi realizada de acordo com critérios padronizados por BLOM (1973), utilizando-se microscopia de contraste de fase, conforme descrito por PAULA *et al.* (2008).

3.5.3.2 – Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos caprinos pelo bioensaio em camundongos

Para o isolamento de *T. gondii* das amostras de sêmen colhidas nos dias -1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 e, semanalmente, até o 70º pós-inoculação, utilizou-se a metodologia proposta por TEALE *et al*. (1982). Amostras de sêmen de cada animal (infectados e controle) foram inoculadas em cinco camundongos, via intraperitoneal, utilizando-se alíquotas de aproximadamente 0,2 mL do ejaculado, acrescidas de solução tampão - PBS (pH 7,2), autoclavada, além de 1000ug de

penicilina e 100µg de estreptomicina/ mL de solução final preparada. Estes camundongos foram observados por 15 minutos após as inoculações para avaliar possíveis efeitos adversos. Em seguida avaliações diárias foram efetuadas até 42 dias pós-inoculação para verificação de manifestações decorrentes da infecção toxoplásmica. Nos animais que eventualmente apresentassem aumento de volume abdominal ou que morressem até o 10º DPI, foi pesquisada a presença de taquizoítos de *T. gondii* por meio de microscopia do exsudato peritoneal dos mesmos. Nos animais que vieram a óbito entre o 11º e 42º DPI, realiizou-se a pesquisa de anticorpos séricos contra *T. gondii* (RIFI), além da pesquisa de cistos cerebrais.

3.5.3.3 – Pesquisa do DNA de *T. gondii* pela PCR nas amostras seminais colhidas

Alíquotas de cada amostra de sêmen, colhidas na periodicidade anteriormente citada foram congeladas a 20ºC negativos para posterior processamento e pesquisa de DNA pela técnica da PCR (FUENTS *et al*., 1996), descrita a seguir.

A) Extração do DNA das amostras do controle positivo

A extração das amostras de DNA de *T. gondii* utilizadas como controle positivo, assim como das demais amostras pesquisadas (sêmen, tecidos de machos, fêmeas e produtos) foi feita com o uso do kit DNA (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagem, USA) seguindo recomendações do fabricante.

B) Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Esta etapa foi realizada de acordo com a técnica descrita por FUENTS *et al*. (1996). Para a detecção do DNA de *Toxoplasma gondii* foi amplificado um fragmento do gene B1 de uma seqüência de 194 pares de base (bps), utilizando-se os iniciadores 5' –GGAACTGCATCCGTTCATGAG-3' ($B1_1$) e 5'-TCTTTAAGAGTTCGTGGTC –3' ($B1_2$). As amostras amplificadas foram previamente expostas a 95°C durante dois minutos. As reações foram realizadas com um volume final de 50 L com 0,5 M de cada oligonucleotídeo iniciador (primers), 1mM de $MgCl_2$, 200mM de mistura de dNTPs, uma concentração de DNA de 40ng/ L e Taq polimerase (1U/reação) Em seguida, foram realizados 35 ciclos de amplificação em termociclador programado para temperaturas de 95°C por um minuto, 57°C por 30 segundos e 72°C por um minuto. Quinze microlitros do produto amplificado foram utilizados para análise por eletroforese em gel de agarose.

C) Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos amplificados na PCR

Alíquotas de 15 L do material amplificado foram separadas por eletroforese (95 volts, 90 minutos de corrida em tampão TBE 1X) em géis de agarose na concentração de 2%, corados com brometo de etídio. Posteriormente os géis foram fotografados com auxílio de um transluminador de luz ultra-violeta, a fim de identificar a presença, ou não do fragmento 194 pb característica do *T. gondii* (FUENTS *et al*., 1996).

3.5.3.4 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* nos testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata dos caprinos reprodutores infectados experimentalmente

A) Imunohistoquímica

Para esta etapa os caprinos reprodutores foram eticamente eutanasiados para colheitas de amostras de testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata. Estas amostras após fixação em formol tamponado a 10% durante 24 horas foram transferidas para solução de álcool 70%, e emblocadas em parafina histológica (GUESDON *et al*., 1979). Posteriormente, foram submetidas ao diagnóstico pelo método imuno-enzimático de amplificação com o complexo estrepto-avidina adicionado à peroxidase-biotina (Kit LSAB/HRP, Dako, USA).

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

Após desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos a dois banhos (10 min) em peróxido de hidrogênio a 30 volumes, para bloqueio da peroxidase endógena, seguidos de lavagens em água destilada e solução tampão (PBS – pH 7,2).

O anticorpo foi diluído a 1:5000 em solução de soroalbumina bovina (BSA) a 1% em PBS contendo 0,1% de azida sódica. Foi utilizado também o BSA a fim de se bloquear possíveis ligações inespecíficas entre outras proteínas presentes

na solução de anticorpos e os tecidos em estudo, evitando-se, desta forma, reações espúrias de fundo.

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

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

A reação foi acompanhada de controles positivo e negativo, sendo este último submetido a todas as etapas do procedimento técnico, suprimindo-se, entretanto, a aplicação do anticorpo primário contra *T. gondii*

B) Bioensaio em camundongos

Para esta etapa foram colhidas, de cada um dos três reprodutores necropsiados, amostras (aproximadamente 50g) de testículos, epidídimos, vesículas seminais e próstatas. Seguindo recomendações de DUBEY *et al.* (2010), estas amostras sofreram digestão péptica antes da inoculação em camundongos (seis para cada amostra). Um volume de 400 mL de solução de pepsina a 1% (6g de pepsina, 600 mL de H_2O e 10mL de ácido clorídrico PA) foi adicionado ao erlenmeyer contendo fragmentos dos tecidos colhidos à necropsia. Estas amostras teciduais foram trituradas e mantidas em agitação constante sob temperatura de 37°C (estufa BOD) durante duas horas para a completa digestão dos tecidos. Em seguida o material foi filtrado em gaze cirúrgica, transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado (3000 rpm por 10 min), sendo descartado o sobrenadante. O sedimento ressuspenso em solução salina (10 X o volume) foi novamente centrifugado (3000 rpm por 10 min). Outras duas lavagens foram realizadas para remoção da solução de pepsina, evitando a digestão de cistos presentes nas amostras. Após proceder a uma última lavagem do material, este foi ressuspenso em solução tampão PBS contendo antibiótico (ampicilina, 1mg/mL).

Os camundongos inoculados (1mL/camundongo) foram observados diariamente, por seis semanas (COSTA *et al*., 1977), para a avaliação da presença de sinais clínicos de toxoplasmose. Naqueles que apresentaram pêlos eriçados e/ou aumento de volume abdominal durante este período, foi pesquisada a presença de taquizoítos de *T. gondii* no exsudato peritoneal, além da realização de “imprint” de pulmão. Dos camundongos inoculados (bioprova) que

sobrevivessem até 42 dias pós- inoculação foram colhidos soros para pesquisa de anticorpos (CAMARGO, 1973) contra *T. gondii* e cérebros para pesquisa de cistos toxoplásmicos.

C) Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* pela PCR nas amostras teciduais colhidas dos machos experimentais

Amostras dos testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata colhidas dos caprinos reprodutores (inoculados e controle) necropsiados, foram armazenadas e posteriormente analisadas pela técnica de PCR conforme item 3.5.3.3.

3.6 – Seleção das fêmeas reprodutoras para a realização da monta natural

Para esta etapa foram selecionadas 12 cabras mestiças, Saanen x Boer, de 12 a 18 meses de idade, não prenhes, sorologicamente negativas para toxoplasmose, neosporose, brucelose e leptospirose, seguindo metodologias descritas anteriormente para os machos. Posteriormente, com o objetivo de verificar a viabilidade da ocorrência da transmissão sexual do *T. gondii*, por meio da monta natural, utilizando machos experimentalmente infectados, estas fêmeas foram sorteadas e randomizadas conforme o delineamento a seguir:

Grupo	Reprodutoras cobertas naturalmente pelo caprino infectado com $2x10^5$ oocistos da cepa "P"	Reprodutoras cobertas naturalmente pelo caprino infectado com $1x10^6$ taquizoítos da cepa "RH"	Reprodutoras cobertas pelo caprino pertencente ao grupo controle	Via de inoculação
I	5	--	--	Sêmen (Monta natural)
II	--	5	--	Sêmen (Monta natural)
III	--	--	2	Sêmen (Monta natural)

Todos os animais foram mantidos em baias individuais, pertencentes ao CPPAR (Centro de Pesquisas em Sanidade Animal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, UNESP. Os animais receberam concentrado, silagem de milho e água *ad libitum*. Exames sorológicos para a detecção de anticorpos contra outras doenças infecciosas que possam provocar desordens reprodutivas (brucelose, neosporose e leptospirose) foram realizados, periodicamente, também nas fêmeas.

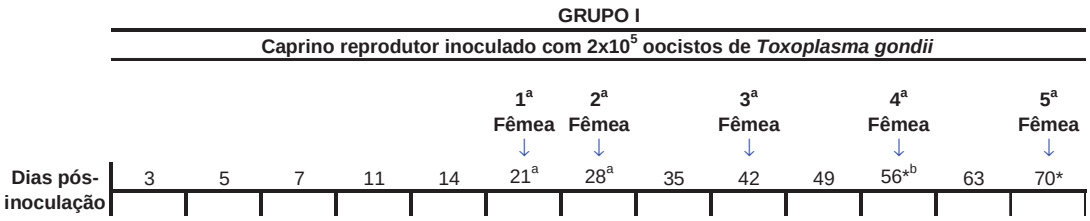
3.6.1 – Determinação dos dias pós-inoculação em que os reprodutores experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*, realizaram a monta natural nas fêmeas soronegativas.

A escolha das datas em que as fêmeas foram cobertas pelos reprodutores experimentalmente infectados com *T. gondii*, baseou-se nos achados de SANTANA *et al.* (2010) . Neste estudo foi diagnosticado, por meio da bioprova e PCR, quais dias pós-inoculação em que os machos que receberam oocistos (cepa

“P”) e taquizoítos (cepa “RH”) de *T. gondii,* eliminaram no sêmen tal parasito. Estabelecem-se, ainda, as datas em que os títulos sorológicos dos camundongos inoculados com amostras seminais positivas para *T. gondii,* apresentaram se mais elevados.

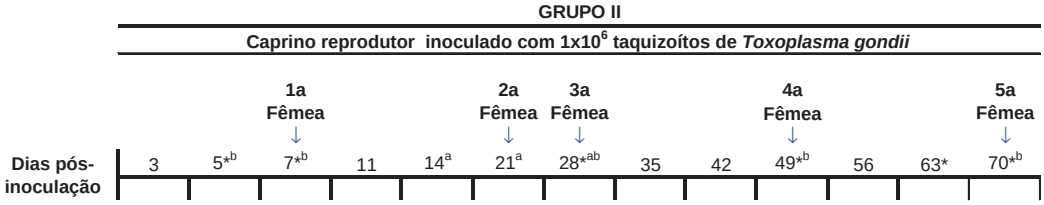
Baseando-se nos resultados obtidos por SANTANA *et al* (2010), as fêmeas do presente estudo foram submetidas à sincronização do ciclo estral para que os machos reprodutores infectados com *T. gondii*, realizassem a cobertura natural conforme os seguintes cronogramas:

Grupo I: Momentos das coberturas das cinco fêmeas pelo reprodutor inoculado com $2x10^5$ oocistos de *Toxoplasma gondii*



*Presença de cistos cerebrais em camundongos inoculados com amostras seminais de caprinos inoculados com oocistos (cepa P) de T.gondii
[a] Pico de títulos sorológicos para os caprinos inoculados com oocistos de T. gondii
[b] Amostra seminal positiva para a PCR

Grupo II: Momentos das coberturas das cinco fêmeas pelo reprodutor inoculado com $1x10^6$ taquizoítos de *Toxoplasma gondii.*



*Presença de cistos cerebrais em camundongos inoculados com amostras seminais de caprinos inoculados com taquizoítos (cepa RH) de *T.gondii*
[a] Pico de títulos sorológicos para os caprinos inoculados com taquizoítos de *T. gondii*
[b] Amostra seminal positiva para a PCR

3.6.2 – Programa de sincronização de cio utilizado nas fêmeas reprodutoras

Para a manifestação de estro nas cabras reprodutoras nas datas pré estabelecidas, utilizou-se o protocolo curto de sincronização de cio para pequenos ruminantes (MAIA, 1998), o qual adota como o dia zero (D 0) de sincronização, a data em que é colocada a esponja vaginal impregnada com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon® - Intervet Schering), e o dia cinco (D 5) o de sua retirada. Simultaneamente, nesta mesma data, é administrado às fêmeas, por via intramuscular 0,5mL de d-cloprostenol (Prolise® - Tecnopec -0,075mg/ml d-cloprostenol), além de 1,5mL de gonadodrofina coriônica eqüina (Novormon® - Intervet Schering - 200UI ECG + PMSG /ml), esperando que o cio/cobertura ocorra no oitavo dia (D 8).

3.7 - Exames realizados nas fêmeas reprodutoras

3.7.1 - Exames clínicos

As fêmeas foram submetidas a exames clínicos (freqüências cardíaca, respiratória e temperatura retal), desde o primeiro dia antes da cobertura e a cada três, até o 14º dia pós-cobertura (DPC). A partir desta data, tais exames foram realizados semanalmente, até o final do período gestacional.

3.7.2 – Determinação da parasitemia

Amostras sanguíneas de todas as fêmeas, obtidas um dia anterior à cobertura, no 1º, 3º, 5º, 7º, 11º e 14º DPC e, semanalmente, até o parto foram

colhidas em tubo estéril contendo EDTA (Acido Etileno-diaminotetraacético). Após centrifugação destas amostras (3000 g por 15 minutos) a camada leucocitária foi cuidadosamente aspirada com auxílio de pipeta Pasteur e inoculada intraperitonealmente em grupos de três camundongos. Estes foram observados por 15 minutos após as inoculações para avaliar possíveis efeitos adversos. Em seguida, realizaram-se avaliações diárias até 42º dia pós-inoculação para diagnosticar possíveis manifestações ocasionadas pela infecção toxoplásmica.

Nos animais que apresentaram aumento de volume abdominal ou que pereceram até o 10º DPI, pesquisou-se a presença de taquizoítos de *T. gondii* por meio da microscopia do exsudato peritoneal. Nos animais que morreram a partir do 11º até o 42º DPI, foram pesquisados anticorpos séricos, títulos maiores ou iguais a 1:64 , contra *T. gondii* (RIFI) e cistos cerebrais.

3.7.3 – Resposta imune humoral (ELISA-teste)

Nas amostras de soro colhidas das cabras, nos dias -14, -7, -1, 3, 6, 9, 11, 14 e semanalmente até o final do período gestacional, pesquisou-se a presença de anticorpos contra *T. gondii* por meio do ELISA teste (Enzyme linked immunosorbent assay).

Para o ELISA teste preparou-se uma suspensão de taquizoítos (10^7 – 10^8) parasitos/ml) que foi submetida a 11 ciclos de congelamento a 70º C negativos e descongelamento a 35º C, em banho-maria. Após o último descongelamento, o material foi mantido em banho de gelo e sonicado por três ciclos de um a dois segundos. Para cada 1ml de material sonicado foi adicionado 1µl de solução

contendo 0,25M de phenylmethanesulfonyl fluoride; alfa-toluenesulfonyl fluoride (PMSF) e 1µl de solução leupeptina 0,1%. A mistura foi mantida em agitação lenta por 12 horas, a 4º C e, em seguida, foi centrifugada a 18000 g por 60 minutos. O sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 0,5ml e armazenados a -70º C. A concentração protéica do antígeno solúvel, utilizado no ELISA –teste, foi determinada pelo médoto de HARTREE (1972).

A) Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado

Para esta etapa foi padronizado o uso da diluição ótima do antígeno na concentração de 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), e os soros de referência positivo e negativo na diluição de 1/200 em tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS – Tween), acrescido de 5% de soro normal de coelho. O conjugado usado, constituído de anticorpo monoclonal anti-IgG de Cabra/Ovelha, acoplado à fosfatase alcalina, foi diluído a 1/50000 em PBS-Tween, acrescido de 5% de soro normal de coelho.

B) Soros de referências positivo e negativo

Como soro de referência positivo foi utilizado amostra de sangue colhida no 28º DPI, do caprino macho inoculado com oocistos de *T. gondii*, após comprovada soropositividade tanto pela RIFI como pelo Elisa. Para a amostra de soro de referência negativa foi utilizado amostra de sangue colhido do mesmo caprino macho no período pré-experimental, comprovadamente negativo pelas mesmas técnicas.

C) Reação de ensaio imunoenzimático (ELISA-teste)

A cada poço da microplaca foram adicionados 100µl do antígeno solúvel, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6, ajustando-se sua concentração protéica para 5µg/ml. As placas foram incubadas por 12 horas, à temperatura de 4º C, em câmara úmida, e lavadas por três vezes consecutivas em PBS-Tween 20. Posteriormente, estas placas foram bloqueadas com leite em pó diluído a 6% em PBS Tween 20, 200µl por poço, em câmara úmida, a 37º C por 120 minutos. Os soros das fêmeas caprinas a serem avaliados e os soros de referência positivos e negativos foram ensaiados diluídos a 1/200 em PBS-Tween, adicionados de 5% de soro normal de coelho. Após a adição de 100µL dos soros diluídos, as microplacas foram incubadas a 37º C por 90 minutos, em câmara úmida e lavadas conforme descrição acima. A cada poço da microplaca adicionou-se 100µL de conjugado acoplado à fosfatase alcalina anti-IgG de caprino, diluído a 1/50000 em PBS acrescido de 5% de soro normal de coelho. As placas foram incubadas a 37ºC, por 90 minutos e lavadas novamente. A cada poço da microplaca foram adicionados 100µL do substrato pNPP (Paranitrofenilfosfato) diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8.

A leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA, com filtro de 405nm, adotando-se como “branco” da reação o poço da microplaca que continha todos os elementos da reação com exceção do soro das fêmeas caprinas.

D) Avaliação dos valores de absorbância dos soros testados

Os valores de absorbância dos soros testados foram comparados à média dos valores encontrados para as amostras de soro de referência negativas para *Toxoplasma gondii*. Desta forma, valores de absorbância iguais ou acima desta média foram aceitos como positivos e aqueles que se mostraram com valores abaixo desta média foram aceitos como negativos para o parasitismo.

3.7.4 – Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos das fêmeas experimentais e em seus "produtos"

Nestas amostras pesquisou-se a presença de *T. gondii* por meio da imunohistoquímica (item 3.5.3.4), do bioensaio, (DUBEY *et al*, 1980), e da técnica de PCR (FUENTES *et al*, 1996). Imediatamente após o parto ou da ocorrência de quaisquer alterações tais como aborto ou nascimento de prematuros, as fêmeas foram eticamente eutanasiadas, para colheita de amostras dos seguintes tecidos: musculatura esquelética e cardíaca, cérebro/cerebelo, baço, fígado, útero, vagina e ovário.

Nos "produtos" resultantes das gestações também foram pesquisados pelo bioensaio e PCR o parasitismo por *T. gondii* nas amostras de placenta, cérebro, musculatura esquelética, fígado e baço.

3.8 – Análise estatística

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

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

4- RESULTADOS

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

Camundongos inoculados intraperitonealmente com a cepa “P” foram medicados com sulfadiazina durante 10 dias para obtenção de maiores quantidades de cistos de *T. gondii*. Decorridos 30 dias pós-inoculação, 20 camundongos foram eutanasiados, sendo removidos os encéfalos que posteriormente foram administrados aos gatos experimentais.

4.2 - Obtenção de oocistos de *T.gondii*

Para esta etapa experimental foram utilizados dois gatos, sendo que do primeiro animal inoculado, via oral, com 1500 cistos teciduais de *T.gondii* presentes em cérebros de camundongos, foram recolhidos aproximadamente 1,0

x 10^6 oocistos, do 4° ao 9° dia pós inoculação (DPI). O pico de eliminação ocorreu no quarto dia (4,85 x 10^5 oocistos).

Do segundo gato inoculado com cistos, foram isolados 6,125 x 10^5 oocistos do 5º ao 7º DPI, ocorrendo o pico de liberação no 6° DPI (3,406 x 10^5 oocistos).

Os oocistos produzidos, após esporulação, foram identificados como de *T. gondii* por meio de critérios morfológicos (ZAMAN, 1970) e pela infectividade utilizando-se inoculação intraperitoneal em camundongos de 2500 oocistos por animal, totalizando 15 camundongos (DUBEY *et al*., 1972). Tais camundongos vieram a óbito entre o 10º e o 12º dia pós-inoculação. No lavado peritoneal de 80,0% dos camundongos, que vieram a óbito, foram encontrados taquizoítos viáveis em quantidades variadas. Os camundongos sobreviventes após seis semanas de inoculação apresentavam cistos cerebrais de *T.gondii.*

4.3 - Obtenção de taquizoítos de *T. gondii*

Após padronização da técnica para manutenção da cepa "RH" de *T.gondii* em camundongos, foi possível obter lavados peritoneais ricos em taquizoítos, os quais foram inoculados em novos camundongos, a cada dois dias, para a manutenção da cepa. Além disso, elaborou-se a preparação de antígenos destinados a confecção de lâminas para RIFI e também para a preparação das microplacas destinadas à execução do ELISA-teste.

4.4 - Seleção e inoculação dos caprinos reprodutores experimentais

Pelos resultados dos exames sorológicos realizados em 10 caprinos machos, relativos à presença de anticorpos contra *Toxoplasma gondii, Neospora*

caninum, Brucela sp e Leptospira sp sorovares *L. pomona, L. icterihaemorrhagea e L. canicula,* foi possível selecionar três caprinos da raça Saannen, sorologicamente negativos para as quatro enfermidades supracitadas. Tais animais foram sorteados, distribuídos e inoculados conforme item 3.4. Os resultados sorológicos encontram-se sumariados a seguir:

Enfermidade avaliada/ nº de caprinos machos				
Sorologia	**Toxoplasmose**	**Neosporose**	**Brucelose**	**Leptospirose**
Positiva	5	4	0	0
Negativa	5	6	10	10
Total	10	10	10	10

4.5 – Exames realizados nos caprinos reprodutores experimentalmente infectados

4.5.1 – Exames clínicos

Os resultados referentes aos parâmetros clínicos individuais, avaliados nos caprinos machos, estão registrados nas Tabelas 2, 3 e 4 e ilustrados nas Figuras 1, 2 e 3.

Tabela 2. Temperaturas retais individuais aferidas nos caprinos machos experimentais antes e após a inoculação de *Toxoplasma gondii*

Caprino	Inóculo	Dias pós-inoculação/Temperatura retal média (°C)															
		-1	1	3	5	7	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
A	Oocisto	38,5	38,8	38,7	40,5	40,9	39,8	39,0	38,6	38,6	38,1	38,9	38,9	38,7	38,9	38,9	39,1
B	Taquizoíto	39,0	39,1	39,0	39,1	39,5	39,9	39,0	39,3	39,1	38,8	38,8	39,0	39,6	39,2	39,6	39,2
C	Controle	39,1	39,5	39,0	39,3	39,2	39,4	39,8	39,3	39,7	39,1	39,4	39,4	39,7	39,0	39,7	39,0

A: Macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)

Tabela 3. Freqüências cardíacas individuais em batimentos por minuto (bpm) mensurada nos caprinos machos experimentais antes e após inoculação de *Toxoplasma gondii*.

Caprino	Inóculo	Dias pós-inoculação/Frequência cardíaca média (bat/min)															
		-1	1	3	5	7	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
A	Oocisto	80	104	96	112	80	136	100	96	108	100	100	100	92	120	120	100
B	Taquizoíto	116	96	124	76	100	92	120	120	108	108	116	108	112	104	124	96
C	Controle	100	112	120	110	120	120	116	80	112	92	100	120	112	116	96	108

A: Macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)

Tabela 4: Freqüência respiratória individuais em movimentos por minuto (mpm) aferidas nos caprinos machos antes e após inoculação de *Toxoplasma gondii*.

Caprino	Inóculo	Dias pós-inoculação/Freqüência repiratória média (mov./min)															
		-1	1	3	5	7	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
A	Oocisto	32	32	32	32	28	44	36	36	40	36	40	44	36	60	52	44
B	Taquizoíto	28	28	28	32	28	28	60	32	36	40	32	36	32	40	44	48
C	Controle	24	28	32	28	32	32	28	36	28	28	32	32	40	48	36	28

A: Macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)

Considerando 38,0 a 40,5℃ como parâmetro de normalidade para a temperatura retal na espécie caprina, pelos resultados clínicos obtidos (Tabela 2 e Figura 1) não foi possível diagnosticar ao longo de todo o experimento, qualquer alteração de temperatura que pudesse ser atribuída à infecção toxoplásmica nos reprodutores experimentais.

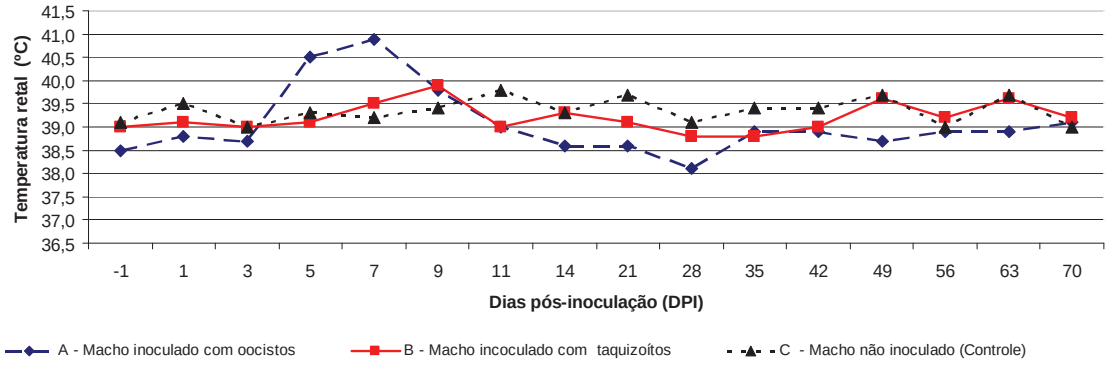


Figura 1. Temperaturas retais individuais aferidas do caprino macho não inoculado (C - Controle) e dos caprinos machos inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii,* nos períodos pré e pós inoculação.

Baseando-se nos parâmetros de normalidade de 70 a 90 batimentos por minuto (bpm), detectou-se que a freqüência cardíaca dos três caprinos (Tabela 3 e Figura 2) alterou-se em várias datas de avaliação, tanto nos animais inoculados com *T. gondii,* como naquele não inoculado (controle).

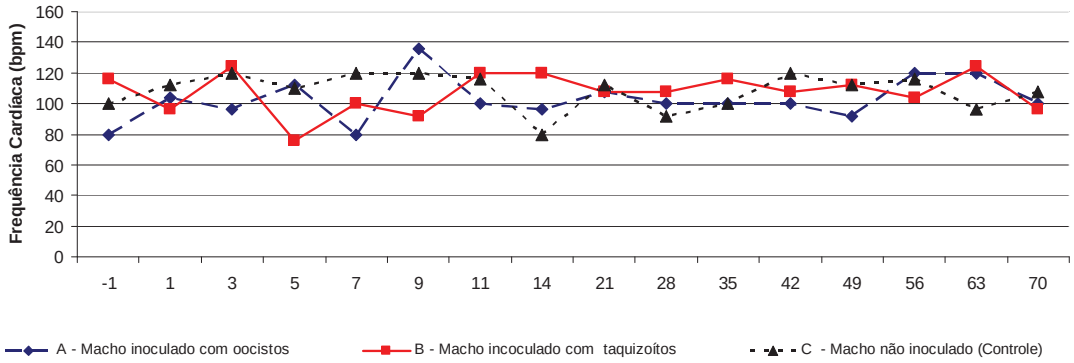


Figura 2. Freqüências cardíacas individuais, em batimentos por minuto (bpm), aferidas do caprino macho não inoculado (C - Controle) e dos caprinos machos inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e com 1 x 10^6 taquizoítos(B) de *Toxoplasma gondii,* nos períodos pré e pós inoculação.

Considerando como parâmetro de normalidade o intervalo de 20 a 40 movimentos por minuto, os resultados referentes às mensurações de freqüência respiratória (Tabela 4 e Figura 3) revelam uma grande oscilação entre os valores mínimos e máximos deste parâmetro nos três caprinos.

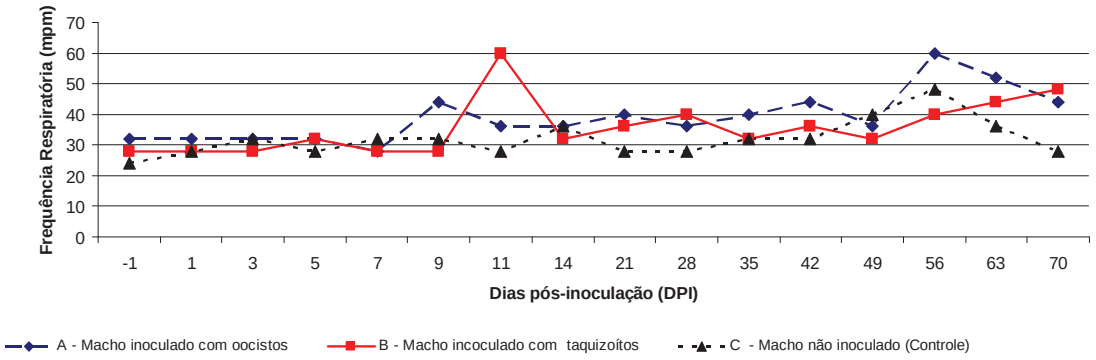


Figura 3. Freqüências respiratórias individuais, em movimentos por minuto (mpm), aferidas do caprino macho não inoculado (C - Controle) e dos caprinos machos inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii,* nos períodos pré e pós inoculação.

Os resultados da análise estatística referentes aos parâmetros clínicos avaliados dos três caprinos machos não inoculado e inoculados, estão sintetizados na Tabela 5. Analisando esta Tabela, observa-se que, apesar de ter havido diferença estatística entre os valores médios das temperaturas retais e das freqüências respiratórias, estes estão dentro dos limites de normalidade para a espécie doméstica em questão, não podendo, portanto, serem atribuídas ao parasitismo toxoplásmico.

Tabela 5: Médias e desvio padrões dos parâmetros clínicos observados nos períodos pré e pós-inoculação de caprinos não inoculado (C - Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) ou com 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii.*

Parâmetros Clínicos / Médias e Desvio Padrões							
Caprino	**Temp**		**FC**		**FR (FR transf)***		
A	38,74±0,26	b	102,75±14,36	a	39 (0,0266)±8,33(0,01)	b	
B	39,2±0,31	a	107,50±13,14	a	35,75 (0,0293)±8,94(0,01)	ab	
C	39,35±0,27	a	108,37±11,74	a	32 (0,0320)±5,84(0,01)	a	
Média	39,12		106,20		35,58 (0,0294)		
CV (%)	0,722		12,35		18,36		
F (Pr)	17,32 (>0,0001)		0,85 (0,4336)		4,15 (0,022)		

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, Pr<0,05).
* Transformação realizada para atender as pressuposições de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros (FR = 1/FR)

4.5.2 – Resposta Imune Humoral (RIFI)

Na Tabela 6 estão as recíprocas dos títulos sorológicos dos caprinos machos, obtidos por meio da RIFI, realizada segundo CAMARGO (1964).

A soroconversão (título ≥ 64) do macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii*, ocorreu a partir do 28º DPI, o que comprova a infectividade toxoplásmica do inóculo administrado. No macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos, via subcutânea, a soroconversão foi mais precoce (14° DPI).

O animal mantido como controle não apresentou, como esperado, em nenhuma data, anticorpos contra o protozoário em questão.

Títulos sorológicos máximos (1:4096) foram detectados do 21º ao 42º DPI no animal que recebeu taquizoítos e no 35º DPI no caprino inoculado com

oocistos. Naquele, o título decresceu a partir do 49º DPI e manteve o mesmo título (2048) até o final do experimento (70ºDPI). No caprino inoculado com oocistos, o título decresceu mais precocemente (42ºDPI), atingindo 1024 na última data.

Tabela 6. Recíproca dos títulos sorológicos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) dos caprinos machos não inoculado (C - Controle) e inoculados experimentalmente com 2x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii* .

Caprino	Inóculo	Dias pós-inoculação (DPI) / Recíproca dos títulos sorológicos																
		-14	-1	1	3	5	7	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
A	Oocisto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2048	4096	2048	2048	1024	1024	1024
B	Taquizoíto	-	-	-	-	-	-	-	-	1024	4096	4096	4096	4096	2048	2048	2048	2048
C	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)
- : Negativo - Amostra sorológica negativa (RIFI < 1:64)

4.5.3 – Exames no sistema reprodutor dos caprinos infectados experimentalmente

4.5.3.1 – Colheita do sêmen

Com o uso do eletro-ejaculador foi possível colher amostras de ejaculados dos caprinos, as quais foram avaliadas quanto aos parâmetros espermáticos. Posteriormente, nestas mesmas amostras, também, pesquisou-se a presença do protozoário por meio da bioprova e PCR.

4.5.3.2 - Avaliação espermática

Os valores dos parâmetros obtidos nas sete amostras de sêmen colhidas de cada animal, encontram-se sumariados na Tabelas 7 e ilustrados nas Figuras 4, 5, 6, 7 e 8.

Tabela 7. Parâmetros seminais de caprinos machos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii.*

DPI	Caprino	Inóculo	Parâmetros Seminais				
			Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Patologia (%)	Concentração (x 10^8sptz/mL)
-1	A	Oocisto	1,2	80	3	3	11
	B	Taquizoíto	1,3	70	3	1	30
	C	Controle	0,9	80	4	0,6	41
1	A	Oocisto	0,7	85	2	1,26	31
	B	Taquizoíto	1	80	3	0,6	45,3
	C	Controle	1,2	85	4	0,9	13,9
3	A	Oocisto	0,7	85	3	0	6
	B	Taquizoíto	0,9	80	4	1,01	39,4
	C	Controle	1,5	70	3	0	32
5	A	Oocisto	0,8	80	4	0	33,3
	B	Taquizoíto	1	85	4	1,2	30,9
	C	Controle	0,9	90	4	1,2	27
7	A	Oocisto	0,9	80	3	1,4	17,3
	B	Taquizoíto	0,8	75	4	11,4	10,5
	C	Controle	1,1	80	4	0	9
11	A	Oocisto	1,4	85	4	1,7	11,5
	B	Taquizoíto	1,2	85	4	0,6	28
	C	Controle	1,3	70	3	0,7	17
14	A	Oocisto	1	70	3	0,4	7,8
	B	Taquizoíto	1,1	80	4	0,8	18
	C	Controle	1	75	3	0,4	12

DPI - Dias pós inoculação

Segundo MAIA (1998), o volume de ejaculado considerado normal para pequenos ruminantes, a partir de 10 meses de idade, é de 1,0mL no mínimo. Não foi possível obter esta quantidade em todas as datas, nos três reprodutores (Tabela 7). A metodologia utilizada na colheita de sêmen e as variações individuais dos animais, certamente influenciaram na irregularidade destas quantificações. Entretanto tal fato não pode ser atribuído ao parasitismo por *T. gondii*.

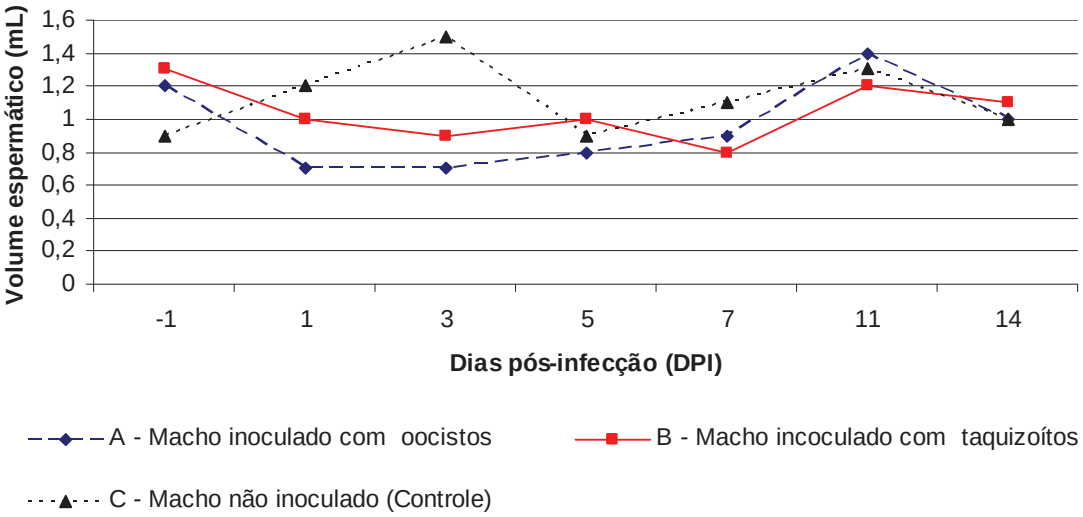


Figura 4. Volume espermático (mL) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii* nos períodos pré e pós inoculação.

Segundo o mesmo autor supracitado, a motilidade deve ser de no mínimo 70%, condição esta alcançada por todos os animais em todas as datas (Figura 5).

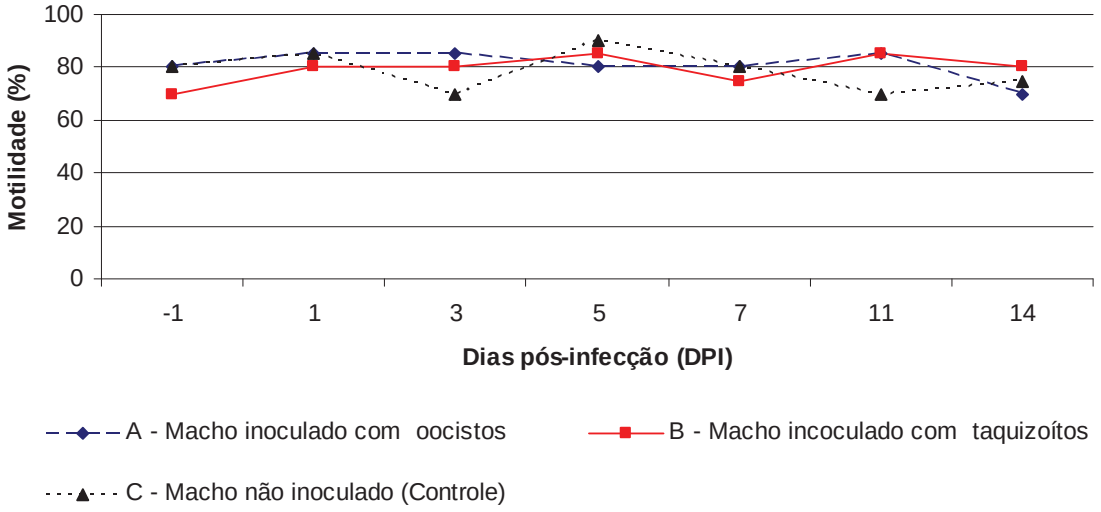


Figura 5. Motilidade espermática (%) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii.*

Quanto aos parâmetros vigor e concentrações (Figuras 6 e 8) nota-se uma similaridade entre os valores obtidos nos três grupos.

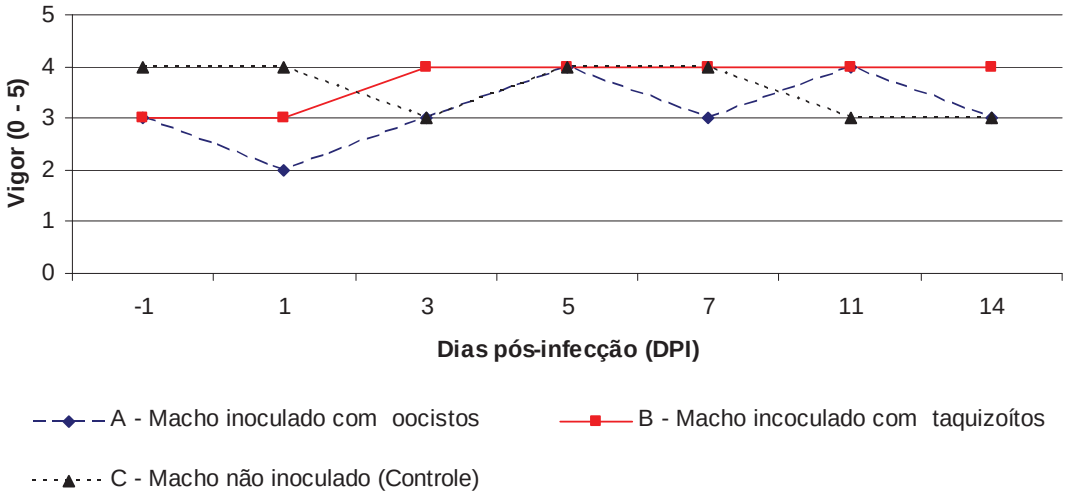


Figura 6. Vigor espermático (0 - 5) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii.*

No que se refere à presença de alterações morfológicas nas amostras seminais avaliadas (Figura 7), nota-se também certa similaridade entre os valores obtidos, com exceção do valor encontrado no macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos no 7º DPI. Observou-se nesta data elevada quantidade de alterações espermáticas, certamente ocasionadas por falhas na colheita e armazenamento da amostra seminal.

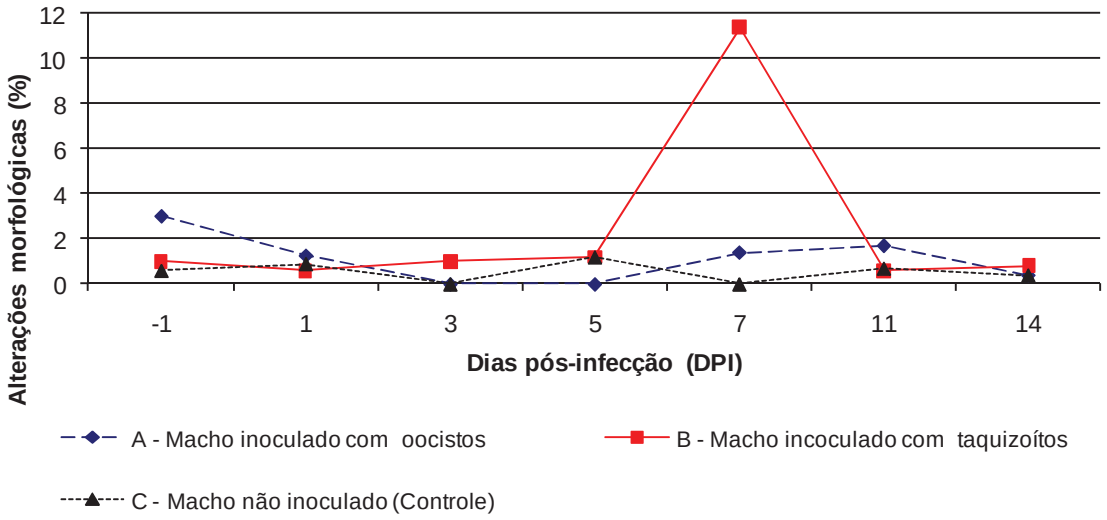


Figura 7. Alterações morfológicas espermáticas (%) de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii.*

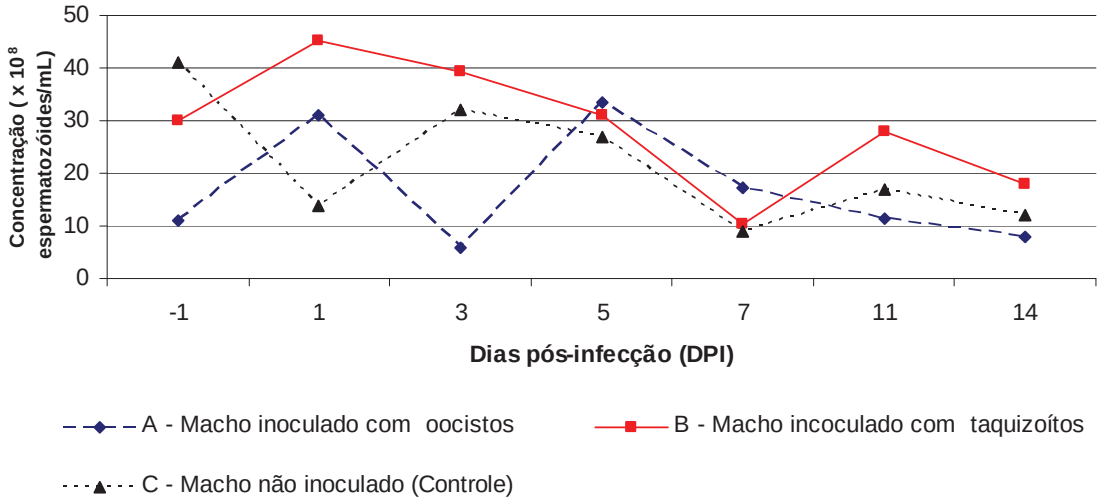


Figura 8. Concentração espermática (x 10^8 espermatozóides/mL) de caprinos não inoculado (C – Controle), inoculados experimentalmente com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *Toxoplasma gondii.*

Os resultados da análise estatística referentes aos parâmetros espermáticos avaliados dos três caprinos machos não inoculado (C) e inoculados (A e B), estão na Tabela 8. Observa-se que não houve diferença significativa (P > 0,05) entre os valores quanto aos cinco parâmetros seminais estudados.

Tabela 8. Resultados das análises paramétricas e não paramétricas dos valores seminais obtidos nos períodos pré e pós-inocualção, dos caprinos não inoculado (C - Controle) e inoculados A - (2 x 10^5 oocistos) e B – (1 x 10^6 taquizoítos) com *Toxoplasma gondii.*

	Parâmetros Seminais ± Desvio Padrão											
Caprino	**Volume**		**Motilidade**		**Vigor**		**Alterações**		**Concentração**			
A	0,95±0,26	a	80,71±5,35	a	3,14±0,69	a	1,10±1,08	a	16,84±11,06	a		
B	1,04±0,17	a	79,28±5,35	a	3,71±0,49	a	0,90±0,24	a	28,87±11,85	a		
C	1,12±0,22	a	78,57±7,48	a	3,57±0,53	a	0,54±0,30	a	21,70±11,87	a		
Média	1,04		79,52		3,48		0,85		22,47			
F (Pr)	2,08(0,353)		0,589(0,744)		3,09(0,212)		2,26(0,322)		2,82(0,243)			

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, P>0,05).
Tabela de contigência: totais seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de qui-quadrado (P>0,05)

4.5.4 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* no sêmen dos caprinos pelo bioensaio em camundongos

Nas amostras seminais colhidas foi possível detectar indiretamente a presença do protozoário, ou seja, detectou-se a presença de anticorpos anti-*T. gondii* nos camundongos inoculados, conforme metodologia proposta por TEALE *et al*. (1982). Os resultados referentes à presença de *T. gondii* em ejaculados seminais estão registrados na Tabela 9**.**

Tabela 9. Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em ejaculados de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) por meio do bioensaio em camundongos.

Caprino	Inóculo	Bioensaio/Dias pós-inoculação de *T. gondii*															
		-1	1	3	5	7	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
A	Oocisto	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
B	Taquizoíto	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
C	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)

- : Amostra seminal com RIFI negativa (< 1:64)

+ : Amostra seminal com RIFI positiva (≥ 1: 64) em camundongos inoculados - Confirmação pela presença de cistos cerebrais

4.5.5 - Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* pela PCR nas amostras seminais

Nas Figuras 20, 21, 22 e 23 estão ilustrados os resultados das análises das amostras seminais colhidas dos caprinos experimentais, inoculados com 2×10^5 oocistos (A) e 1×10^6 taquizoítos (B), submetidas à pesquisa de material genético (DNA) de *T. gondii* pela PCR. Estes resultados estão sintetizados na Tabela 10.

Tabela 10. Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* em ejaculados de caprinos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2×10^5 oocistos (A) e 1×10^6 taquizoítos (B) por meio da eletroforese do material genético amplificados na PCR.

Caprino	**Inóculo**	**PCR / Dias pós-inoculação de *T. gondii***															
		-1	1	3	5	7	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
A	Oocistos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	Taquizoítos	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Macho inoculado com 2×10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1×10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)

- : ausência de *T. gondii*

+ : presença de *T. gondii*

4.5.6 - Pesquisa do *Toxoplasma gondii* em testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata dos caprinos reprodutores infectados experimentalmente

4.5.6.1 – Imunohistoquímica

As amostras de próstata e vesícula seminal do caprino inoculado com oocistos (A), assim como as amostras de epidídimo, próstata e vesícula seminal do caprino inoculado com taquizoítos (B), necropsiados ao 78º DPI, mostraram-se positivas quanto à presença do *T. gondii,* pelo método da imunohistoquimica (Tabela 11). Nenhuma imunomarcação foi identificada nas amostras teciduais do caprino macho não inoculado (C).

Tabela 11. Pesquisa de *Toxoplasma gondiii,* nos tecidos do sistema reprodutor dos caprinos machos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *T. gondii* por meio da imunohistoquímica.

Caprino	Inóculo	Imunohistoquímica			
		Testículo	Epidídimo	Próstata	Vesícula Seminal
A	Oocisto	+	+	+	+
B	Taquizoito	-	+	+	+
C	Controle	-	-	-	-

A: Macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)
- : Amostra tecidual com imunomarcação negativa
+ : Amostra tecidual com imunomarcação positiva

4.5.6.2 - Bioensaio em camundongos

Macerados individuais de testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal, dos três caprinos reprodutores, foram preparados e inoculados, por via intraperitoneal, em camundongos, conforme técnica descrita por DUBEY (1998). Ocorridos quarenta dias, realizou-se a sorologia (RIFI) dos camundongos, sendo detectadas sorologias positivas (RIFI ≥ 1: 64) naqueles inoculados com macerados de testículo, epidídimo e próstata, colhidos do caprino inoculado com 2 x 10^5 oocistos e naqueles que receberam macerados de epidídimo e vesícula seminal do reprodutor inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos (Tabela 12). Como método de confirmação destes resultados nos camundongos positivos para a RIFI, foram pesquisados cistos em amostras cerebrais (SANTANA, 2010).

Tabela 12. Pesquisa de *Toxoplasma gondiii,* nos tecidos do sistema reprodutor dos caprinos machos não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2 x 10^5 oocistos (A) e 1 x 10^6 taquizoítos (B) de *T. gondii* por meio do bioensaio em camundongos.

Caprino	Inóculo	Bioensaio em camundongo			
		Testículo	Epidídimo	Próstata	Vesícula Seminal
A	Oocisto	+	+	+	-
B	Taquizoíto	-	+	-	+
C	Controle	-	-	-	-

A: Macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)
- : Amostra tecidual com RIFI negativa (<1:64)
+ : Amostra tecidual com RIFI positiva (≥ 1: 64) em camundongos inoculados - presença de cistos cerebrais

4.5.6.3 – Detecção de *Toxoplasma gondii* pela PCR

Os resultados referentes à pesquisa de material genético de *Toxoplasma gondii* nos tecidos dos machos reprodutores (PCR) estão na Tabela 13 e Figura 18. Após a realização da eletroforese em gel de agarose, do material genético amplificado na PCR, foi possível comprovar a existência de DNA do referido protozoário em todos os tecidos pesquisados em ambos caprinos inoculados com 2×10^5 oocistos (A) e com 1×10^6 taquizoítos (B) de *T. gondii.*

Tabela 13. Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondiii,* no sistema reprodutor de caprinos experimentais não inoculado (C – Controle) e inoculados com 2×10^5 oocistos (A) e 1×10^6 taquizoítos (B) de *T. gondii* por meio da eletroforese do material genético amplificados na PCR.

Caprino	Inóculo	PCR			
		Testículo	Epidídimo	Próstata	Vesícula Seminal
A	Oocisto	+	+	+	+
B	Taquizoíto	+	+	+	+
C	Controle	-	-	-	-

A: Macho inoculado com 2×10^5 oocistos esporulados, B: Macho inoculado com 1×10^6 taquizoitos, C: Macho não inoculado (Controle)
- : ausência de *T. gondii* na amostra tecidual avaliada
+ : presença de *T. gondii* na amostra tecidual avalida

4.6 – Seleção das cabras reprodutoras para a realização da monta natural

Foram realizados exames sorológicos em 164 fêmeas (Saanen, Boer e ½ sangue Saanen-Boer), pertencentes a uma propriedade rural localizado no município de Monte Santo de Minas, estado de Minas Gerais, cujos resultados estão sintetizados a seguir:

Enfermidade avaliada/ nº cabras				
Sorologia	**Toxoplasmose**	**Neosporose**	**Brucelose**	**Leptospirose**
Positiva	33	14	0	0
Negativa	131	150	164	164
Total	164	164	164	164

Após avaliação de parâmetros anátomo-morfológicos do sistema reprodutor e, considerando ainda, os resultados dos testes sorológicos realizados, foram adquiridas 12 fêmeas negativas para doenças reprodutivas. A seguir, as cabras foram transferidas para o CPPAR - Centro de Pesquisa em Sanidade Animal – FCAV, UNESP, onde foram mantidas durante todo período experimental.

4.7- Exames realizados nas fêmeas reprodutoras

4.7.1- Exames clínicos

Os resultados referentes aos parâmetros clínicos avaliados, nos períodos pré o pós-cobertura das fêmeas experimentais, estão sumariados nas Tabelas 14, 16 e 18 e ilustrados nas Figuras 9, 10 e 11.

Considerando como parâmetro de normalidade, temperaturas retais de 38,0℃ a 40,5℃, não foi possível notar qualquer al teração nas fêmeas reprodutivas, que pudesse ser atribuída à infecção toxoplásmica pós monta natural (Tabela 14 e Figura 9).

Tabela 14: Temperaturas retais aferidas em fêmeas experimentais durante os períodos pré e pós-cobertura (monta natural)

Grupos	Nº Cabra	Dias pós cobertura/Temperatura retal (°C)																								
		-1	**3**	**6**	**9**	**11**	**14**	**21**	**28**	**35**	**42**	**49**	**56**	**63**	**70**	**77**	**84**	**91**	**98**	**105**	**112**	**119**	**126**	**133**	**140**	**147**
I	1031	38,9	39,3	38,8	39,6	38,9	38,7	38,9	38,8	38,8	38,7	38,7	38,8	38,9	38,6	38,7	38,9	38,0	38,7	38,8	39,0	39,0	38,7	38,9	38,5	38,4
	1048	38,9	39,0	39,0	39,2	38,9	39,1	38,8	38,8	39,0	39,3	39,2	38,6	39,0	39,2	39,0	39,0	38,1	39,2	38,6	39,0	38,9	38,6	39,4	38,6	nr
	1055	39,3	39,2	38,8	39,1	39,2	38,5	39,1	39,1	39,0	39,2	38,7	38,8	38,3	38,9	39,0	38,7	38,9	38,7	39,3	38,1	38,9	38,9	39,1	39,0	38,7
	1064	39,0	39,0	38,4	38,9	38,6	39,1	39,1	38,8	38,5	38,9	38,9	38,8	38,3	39,0	38,8	39,1	38,9	39,2	39,0	38,6	39,1	38,8	38,4	38,4	39,4
	1077	39,0	38,5	38,4	38,6	38,9	38,8	39,0	38,7	39,2	38,8	39,1	38,9	38,8	39,1	39,0	38,7	39,0	38,5	39,0	38,8	39,1	38,8	39,5	38,9	nr
	Média	**39,0**	**39,0**	**38,7**	**39,1**	**38,9**	**38,8**	**39,0**	**38,8**	**38,9**	**39,0**	**38,9**	**38,8**	**38,7**	**39,0**	**38,9**	**38,9**	**38,6**	**38,9**	**38,9**	**38,7**	**39,0**	**38,8**	**39,1**	**38,7**	**38,8**
II	1003	39,0	39,2	39,5	39,7	39,1	39,6	38,9	39,0	38,9	39,3	38,8	39,0	38,9	38,6	38,8	39,0	38,7	38,6	38,4	38,8	nr[1]	-	-	-	-
	1013	39,4	39,2	39,2	39,1	38,7	38,8	39,1	39,0	39,1	38,6	39,0	37,9	38,9	38,7	38,8	38,8	38,6	38,5	38,7	39,1	39,3	38,8	nr[2]	-	-
	1032	39,6	40,0	38,6	39,1	39,2	39,2	38,9	39,0	38,8	38,9	39,5	39,0	38,6	38,5	39,0	38,9	38,6	38,0	nr[1]	-	-	-	-	-	-
	1040	39,1	39,2	39,5	39,6	39,2	38,8	39,0	39,1	39,1	38,5	38,7	39,1	38,9	38,8	38,7	39,0	38,9	38,9	39,0	39,2	38,8	38,6	39,4	38,9	nr
	1088	39,1	39,0	39,2	39,3	39,2	39,4	39,1	38,8	39,0	38,9	38,7	39,1	38,9	38,9	38,9	38,9	39,0	39,2	38,9	39,1	38,8	39,3	39,0	39,3	nr
	Média	**39,2**	**39,3**	**39,2**	**39,4**	**39,1**	**39,2**	**39,0**	**39,0**	**39,0**	**38,8**	**38,9**	**38,8**	**38,8**	**38,7**	**38,8**	**38,9**	**38,8**	**38,6**	**38,8**	**39,1**	**39,0**	**38,9**	**39,2**	**39,1**	**-**
III	1012	39,0	39,3	39,1	39,0	39,2	39,2	38,9	39,0	38,8	39,1	39,2	38,9	39,0	39,0	38,7	39,0	38,7	39,8	39,1	39,3	38,4	38,9	39,2	39,2	39,0
	1042	40,0	38,9	38,6	39,3	39,2	39,2	39,2	38,2	38,6	39,0	38,9	39,2	38,6	39,5	38,9	39,1	38,6	39,1	38,8	38,8	38,2	39,2	39,1	39,0	39,6
	Média	**39,5**	**39,1**	**38,9**	**39,2**	**39,2**	**39,2**	**39,1**	**38,6**	**38,7**	**39,1**	**39,1**	**39,1**	**38,8**	**39,3**	**38,8**	**39,1**	**38,7**	**39,1**	**39,0**	**39,1**	**38,5**	**39,1**	**39,2**	**39,1**	**39,3**

I: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 2×10^5 oocistos, II: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 1×10^6 taquizoitos, III- Fêmeas cobertas pelo macho controle,
nr: Data experimental não realizada - Eutanásia das fêmeas e eventuais produtos
nr1: Aborto de natimortos
nr2: Nascimeto de prematuros fracos que posteriormente vieram a óbito

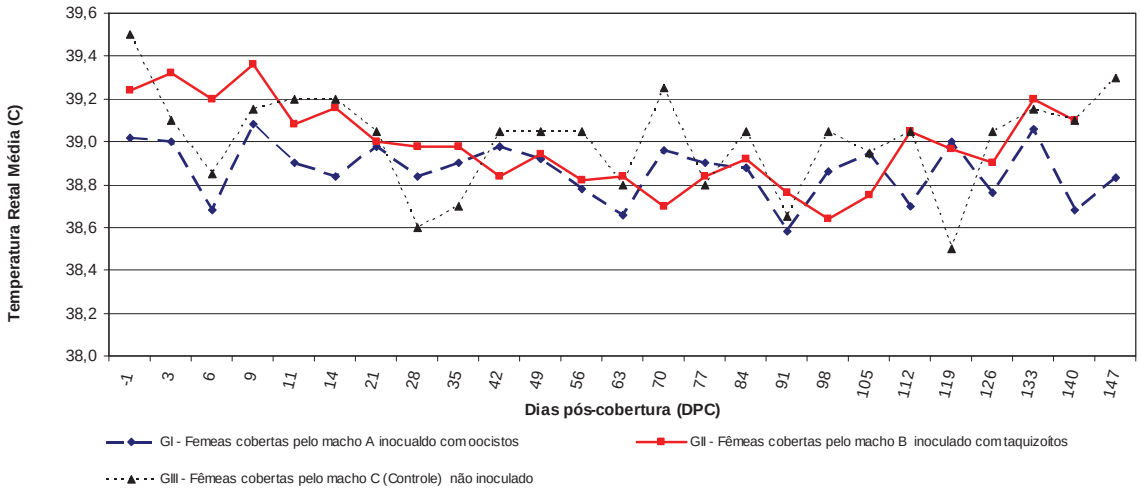


Figura 9: Temperaturas retais médias aferidas das cabras experimentais cobertas naturalmente por reprodutor não inoculado (GIII – Controle) e inoculados experimentalmente com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii.*

Comparando estatisticamente os valores médios da temperatura retal das cabras nos períodos pré e pós-cobertura natural (Tabela 15), confirma-se que, apesar de ter havido diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre os valores médios em algumas datas entre os grupos e dentro do mesmo grupo, estes valores permaneceram dentro da faixa de normalidade estabelecida para este parâmetro clínico, nesta espécie animal.

Tabela 15. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro temperatura retal (ºC) de cabras cobertas naturalmente por reprodutores não inoculado (GIII–Controle) e inoculados com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii.*

Dias pré e pós-monta natural	Grupos Experimentais / Temperaturas retais médias[1] e desvios padrões			DTP*	
	Cabras cobertas naturalmente pelo macho inoculado com oocistos (GI)	Cabras cobertas naturalmente pelo macho inoculado com taquizoítos (GII)	Cabras cobertas pelo macho não inoculado (GIII - Controle)	Valor de F	Pr > F
-1	39,02 ± 0,16 Aa	39,24 ± 0,25 Aab	39,50 ± 0,71 Aa	1,83	0,215
3	39,00 ± 0,31 Aa	39,32 ± 0,39 Aa	39,10 ± 0,28 Aab	1,1	0,372
6	38,68 ± 0,27 Aa	39,20 ± 0,37 Aab	38,85 ± 0,35 Aab	3,26	0,086
9	39,08 ± 0,37 Aa	39,36 ± 0,28 Aa	39,15 ± 0,21 Aab	1,02	0,4
11	38,90 ± 0,21 Aa	39,08 ± 0,22 Aab	39,20 ± 0,00 Aab	1,89	0,206
14	38,84 ± 0,26 Aa	39,16 ± 0,36 Aab	39,20 ± 0,00 Aab	1,85	0,212
21	38,98 ± 0,13 Aa	39,00 ± 0,10 Aab	39,05 ± 0,21 Aab	0,21	0,817
28	38,84 ± 0,15 Aa	38,98 ± 0,11 Aab	38,60 ± 0,57 Ab	2,05	0,185
35	38,90 ± 0,26 Aa	38,98 ± 0,13 Aab	38,70 ± 0,14 Ab	1,37	0,302
42	38,98 ± 0,26 Aa	38,84 ± 0,31 Aab	39,05 ± 0,07 Aab	0,55	0,543
49	38,92 ± 0,23 Aa	38,94 ± 0,34 Aab	39,05 ± 0,21 Aab	0,16	0,854
56	38,78 ± 0,11 Ba	38,82 ± 0,52 Aab	39,05 ± 0,21 Aab	7,72	0,013
63	38,66 ± 0,34 Aa	38,84 ± 0,13 Aab	38,80 ± 0,28 Aab	0,63	0,552
70	38,96 ± 0,23 ABa	38,70 ± 0,16 Bab	39,25 ± 0,35 Aab	4,77	0,038
77	38,90 ± 0,14 Aa	38,84 ± 0,11 Aab	38,80 ± 0,14 Aab	0,51	0,61
84	38,88 ± 0,18 Aa	38,92 ± 0,08 Aab	39,05 ± 0,07 Aab	1,16	0,356
91	38,58 ± 0,49 Aa	38,76 ± 0,18 Aab	38,65 ± 0,07 Aab	0,34	0,721
98	38,86 ± 0,32 Aa	38,64 ± 0,45 Ab	39,05 ± 0,07 Aab	0,99	0,407
105	38,94 ± 0,26 Aa	38,75 ± 0,26 Aab	38,95 ± 0,21 Aab	0,72	0,515
112	38,70 ± 0,37 Aa	39,05 ± 0,17 Aab	39,05 ± 0,35 Aab	1,72	0,238
119	39,00 ± 0,10 Aa	38,97 ± 0,29 Aab	38,50 ± 0,14 Bab	5,09	0,0315
126	38,76 ± 0,11 Aa	38,90 ± 0,36 Aab	39,05 ± 0,21 Aab	1,25	0,344
133	39,06 ± 0,44 Aa	39,20 ± 0,28 Aab	39,15 ± 0,07 Aab	0,11	0,896
140	38,68 ± 0,26 Aa	39,10 ± 0,28 Aab	39,10 ± 0,14 Aab	3,2	0,113
147	38,83 ± 0,51 Aa	- - -	39,30 ± 0,42 Aab	1,11	0,369
DDT**	Valor de F 1,18	2,63	1,96		
	Pr > F 0,278	0,0007	0,013		

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

* Desdobramento dos tratamentos dentro de cada dia

** Desdobramento dos dias dentro de cada tratamento

Caprinos adultos possuem freqüências cardíacas normais que variam de 70 a 90 batimentos por minuto (bpm) segundo SMITH (1993). Na Tabela 16 e Figura 10 nota-se que, em várias datas experimentais este valor máximo (90 bpm) foi superado tanto pelas fêmeas cobertas pelos machos inoculados (oocistos ou taquizoítos), como, também, por aquelas cobertas pelo macho não inoculado (controle). Tal fato, portanto, pode ser atribuído ao estresse momentâneo ou ao manejo dos animais e não ao parasitismo toxoplásmico.

Tabela 16: Freqüências cardíacas aferidas em fêmeas experimentais durante os períodos pré e pós cobertura

Grupos	Nº Cabra	Dias pós cobertura/Frequência cardíaca (bpm)																								
		-1	**3**	**6**	**9**	**11**	**14**	**21**	**28**	**35**	**42**	**49**	**56**	**63**	**70**	**77**	**84**	**91**	**98**	**105**	**112**	**119**	**126**	**133**	**140**	**147**
I	1031	108	120	76	108	108	112	100	100	96	72	68	104	96	120	80	104	60	88	100	68	92	100	104	104	100
	1048	104	104	100	104	80	76	60	88	107	100	104	104	96	108	88	92	64	112	76	58	92	96	100	96	nr
	1055	88	104	84	88	96	84	84	80	80	82	84	84	60	80	96	84	60	72	80	72	64	92	72	84	92
	1064	68	112	92	108	104	80	88	84	92	88	88	104	76	108	92	60	100	68	104	108	96	112	112	100	112
	1077	100	100	88	88	76	96	88	92	72	100	100	84	88	112	100	92	96	84	116	68	64	68	80	108	nr
	Média	**94**	**108**	**88**	**99**	**93**	**90**	**84**	**89**	**89**	**88**	**89**	**96**	**83**	**106**	**91**	**86**	**76**	**85**	**95**	**75**	**82**	**94**	**94**	**98**	**101**
II	1003	100	112	92	96	96	92	100	84	84	80	100	88	96	76	88	80	92	92	100	112	nr[1]	-	-	-	-
	1013	100	88	96	64	92	84	100	92	72	92	100	84	108	92	100	104	100	104	96	100	100	80	nr[2]	-	-
	1032	104	100	72	104	100	92	88	76	84	100	88	80	68	92	92	84	100	100	nr[1]	-	-	-	-	-	-
	1040	80	96	88	108	92	96	100	88	80	96	100	84	88	88	84	96	68	96	88	84	104	104	120	104	nr
	1088	100	60	72	80	64	108	112	104	100	80	88	64	60	88	100	96	104	104	100	84	108	120	72	120	nr
	Média	**97**	**91**	**84**	**90**	**89**	**94**	**100**	**89**	**84**	**90**	**95**	**80**	**84**	**87**	**93**	**92**	**93**	**99**	**96**	**95**	**104**	**101**	**96**	**112**	**-**
III	1012	112	72	80	80	64	100	100	120	104	96	100	64	80	92	88	92	88	100	96	84	96	76	64	64	104
	1042	52,0	72,0	76,0	72,0	80,0	76,0	80,0	88	80	80	68	100	92	100	92	96	88	96	100	88	100	108	76	64	92
	Média	**82**	**72**	**78**	**76**	**72**	**88**	**90**	**104**	**92**	**88**	**84**	**82**	**86**	**96**	**90**	**94**	**88**	**98**	**98**	**86**	**98**	**92**	**70**	**64**	**98**

I: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 2×10^5 oocistos, II: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 1×10^6 taquizoitos, III- Fêmeas cobertas pelo macho controle,

nr: Data experimental não realizada - Eutanásia das fêmeas e eventuais produtos

nr[1]: Aborto de natimortos

nr[2]: Nascimeto de prematuros fracos que posteriormente vieram a óbito

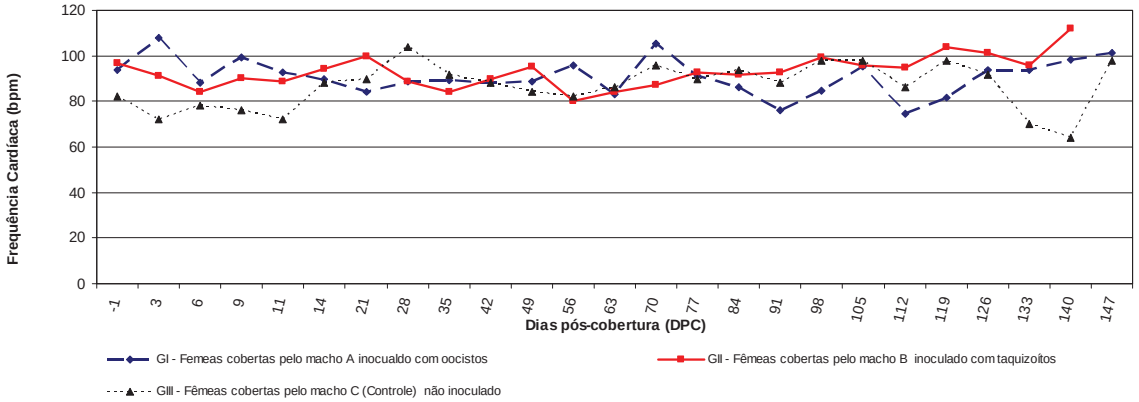


Figura 10: Freqüências cardíacas médias aferidas em cabras cobertas naturalmente por reprodutores não inoculado (GIII – Controle) e inoculados com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii.*

Os resultados referentes à análise estatística efetuada com os valores médios das freqüências cardíacas das fêmeas, nos períodos pré e pós-cobertura natural (Tabela 17), confirmam que, apesar de ter havido diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre os valores médios, em algumas datas, entre os grupos, estes valores ou estavam dentro da faixa de normalidade para este parâmetro ou não diferiram estatisticamente das médias apresentadas em outras datas, dentro do mesmo grupo, demonstrando não ter havido alteração clínica nas cabras ao longo de todo o período de avaliação.

Tabela 17. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro freqüência cardíaca (bpm) de cabras cobertas naturalmente por reprodutores não inoculado (GIII – Controle) e inoculados com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii.*

Dias pré e pós-monta natural	Grupos Experimentais / Frequências cardíacas médias[1] e desvios padrões			DTP*	
	Cabras cobertas pelo macho inoculado com oocistos (GI)	Cabras cobertas pelo macho inoculado com taquizoítos (GII)	Cabras cobertas pelo macho não inoculado (GIII - Controle)	Valor de F	Pr > F
-1	93,60 ± 16,15 Aa	96,80 ± 9,55 Aa	82,00 ± 42,43 Aa	0,23	0,799
3	108,00 ± 8,00 Aa	91,20 ± 19,47 ABa	72,00 ± 0,00 Ba	5,24	0,03
6	88,00 ± 8,94 Aa	84,00 ± 11,31 Aa	78,00 ± 2,83 Aa	0,8	0,479
9	99,20 ± 10,35 Aa	90,40 ± 18,24 Aa	76,00 ± 5,66 Aa	1,96	0,196
11	92,80 ± 14,25 Aa	88,80 ± 14,25 Aa	72,00 ± 11,31 Aa	1,58	0,257
14	89,60 ± 14,59 Aa	94,40 ± 8,76 Aa	88,00 ± 16,97 Aa	0,2	0,818
21	84,00 ± 14,70 Aa	100,00 ± 8,49 Aa	90,00 ± 14,14 Aa	2,32	0,153
28	88,80 ± 7,69 Aa	88,80 ± 10,35 Aa	104,00 ± 22,63 Aa	1,66	0,242
35	89,40 ± 13,70 Aa	84,00 ± 10,20 Aa	92,00 ± 16,97 Aa	0,4	0,684
42	88,40 ± 12,03 Aa	89,60 ± 9,21 Aa	88,00 ± 11,31 Aa	0,02	0,98
49	88,80 ± 14,25 Aa	95,20 ± 6,57 Aa	84,00 ± 22,63 Aa	0,54	0,599
56	96,00 ± 10,95 Aa	80,00 ± 9,38 Aa	82,00 ± 25,46 Aa	2,27	0,159
63	83,20 ± 15,34 Aa	84,00 ± 19,80 Aa	86,00 ± 8,49 Aa	0,01	0,985
70	105,60 ± 15,13 Aa	87,20 ± 6,57 Aa	96,00 ± 5,66 Aa	3,72	0,066
77	91,20 ± 7,69 Aa	92,80 ± 7,16 Aa	90,00 ± 2,83 Aa	0,14	0,86
84	86,40 ± 16,40 Aa	92,00 ± 9,80 Aa	94,00 ± 2,83 Aa	0,3	0,748
91	76,00 ± 20,20 Aa	92,80 ± 14,53 Aa	88,00 ± 0,00 Aa	1,23	0,335
98	84,80 ± 17,30 Aa	99,20 ± 5,22 Aa	98,00 ± 2,83 Aa	1,68	0,64
105	95,20 ± 16,83 Aa	96,00 ± 5,66 Aa	98,00 ± 2,83 Aa	0,02	0,992
112	74,80 ± 19,27 Aa	95,00 ± 13,61 Aa	86,00 ± 2,83 Aa	1,47	0,285
119	81,60 ± 16,15 Aa	104,00 ± 4,00 Aa	98,00 ± 2,83 Aa	4,04	0,062
126	93,60 ± 16,15 Aa	101,33 ± 20,13 Aa	92,00 ± 22,63 Aa	0,24	0,79
133	93,60 ± 16,88 Aa	96,00 ± 33,94 Aa	70,00 ± 8,49 Aa	1,08	0,398
140	98,40 ± 9,21 Aa	112,00 ± 11,31 Aa	64,00 ± 0,00 Ba	12,24	0,0076
147	101,33 ± 10,07 Aa	- - -	98,00 ± 8,49 Aa	0,15	0,72
DDT**	Valor de F 1,51	1,33	1,16		
	Pr > F 0,0591	0,174	0,299		

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

* Desdobramento dos tratamentos dentro de cada dia

** Desdobramento dos dias dentro de cada tratamento

Considerando como parâmetros de normalidade valores de freqüência respiratória entre 20 a 30 movimentos por minuto (SMITH, 1993), observa-se que, nos dois grupos de fêmeas cobertas pelos machos inoculados assim como no grupo de fêmeas cobertas pelo macho controle, em algumas datas, os animais apresentaram valores acima e abaixo desta faixa de normalidade (Tabela 18 e Figura 11). Tal fato, não está relacionado ao parasitismo toxoplásmico e sim às condições de manejo a que esses animais foram submetidos.

Tabela 18: Freqüências respiratórias aferidas em cabras experimentais durante os períodos pré e pós cobertura

Grupos	Nº Cabra	Dias pós cobertura/Freqüência repiratória (mpm)																								
		-1	**3**	**6**	**9**	**11**	**14**	**21**	**28**	**35**	**42**	**49**	**56**	**63**	**70**	**77**	**84**	**91**	**98**	**105**	**112**	**119**	**126**	**133**	**140**	**147**
I	1031	32	44	36	44	44	48	48	44	36	32	32	40	32	32	32	48	36	48	36	40	44	32	36	44	36
	1048	44	36	40	44	36	60	32	28	48	32	32	44	32	48	40	40	44	40	48	62	44	44	48	44	nr
	1055	40	52	32	36	44	40	28	48	44	40	44	44	32	32	32	44	36	32	36	28	32	36	40	36	36
	1064	36	28	32	32	44	32	32	32	36	32	28	40	32	36	44	36	32	36	32	40	36	44	32	28	36
	1077	32	36	36	32	32	44	44	48	48	44	44	36	48	44	40	40	36	40	48	44	52	40	48	44	nr
	Média	**37**	**39**	**35**	**38**	**40**	**45**	**37**	**40**	**42**	**36**	**36**	**41**	**35**	**38**	**38**	**42**	**37**	**39**	**40**	**43**	**42**	**39**	**41**	**39**	**36**
II	1003	36	28	40	40	44	40	32	32	32	48	32	32	44	48	44	36	36	32	36	44	nr[1]	-	-	-	-
	1013	48	32	32	32	42	44	44	40	48	48	32	36	44	40	64	56	56	48	40	36	40	40	nr[2]	-	-
	1032	36	44	32	60	32	44	32	48	40	36	36	44	44	36	40	48	36	28	nr[1]	-	-	-	-	-	-
	1040	36	44	44	44	36	40	36	38	40	40	36	48	48	40	32	44	48	52	52	36	36	40	32	44	nr
	1088	36	32	40	72	28	40	40	48	44	32	40	52	44	48	40	52	40	36	48	40	48	48	48	36	nr
	Média	**38**	**36**	**38**	**50**	**36**	**42**	**37**	**41**	**41**	**41**	**35**	**42**	**45**	**42**	**44**	**47**	**43**	**39**	**44**	**39**	**41**	**43**	**40**	**40**	**-**
III	1012	36	32	44	44	48	52	44	44	44	32	40	44	44	36	44	52	32	44	48	36	40	36	28	48	44
	1042	40	28	28	32	32	44	28	32	44	28	44	44	36	38	32	40	32	36	28	32	36	40	36	36	36
	Média	**38**	**30**	**36**	**38**	**40**	**48**	**36**	**38**	**44**	**30**	**42**	**44**	**40**	**37**	**38**	**46**	**32**	**40**	**38**	**34**	**38**	**38**	**32**	**42**	**40**

I: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 2×10^5 oocistos, II: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 1×10^6 taquizoitos, III- Fêmeas cobertas pelo macho controle,

nr: Data experimental não realizada - Eutanásia das fêmeas e eventuais produtos

nr[1]: Aborto de natimortos

nr[2]: Nascimeto de prematuros fracos que posteriormente vieram a óbito

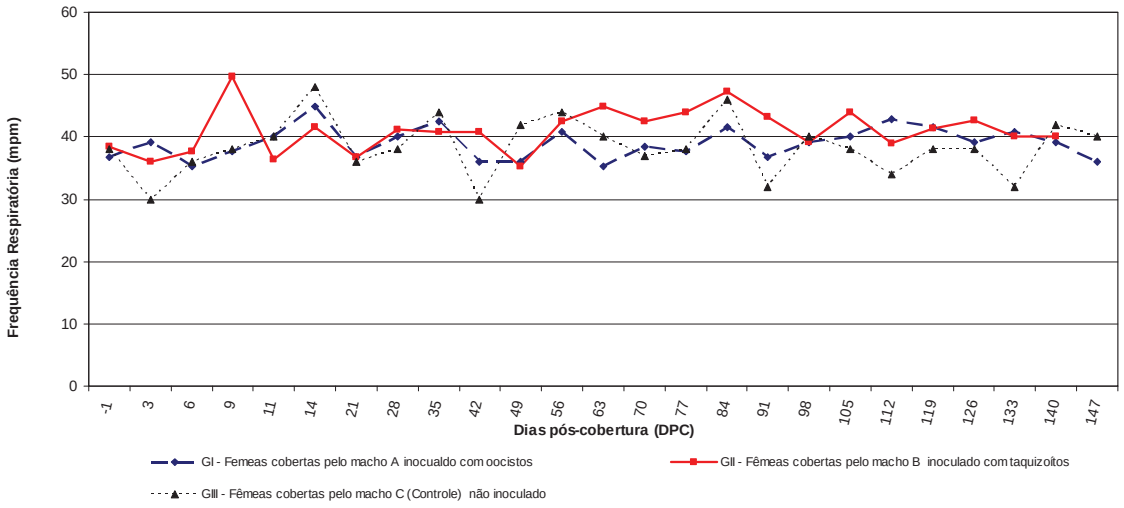


Figura 11: Freqüências respiratórias médias aferidas em cabras experimentais cobertas naturalmente por reprodutores não inoculado (GIII – Controle) e inoculados experimentalmente com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii.*

A análise estatística dos valores médios das freqüências respiratórias obtidos das fêmeas, nos períodos pré e pós-cobertura natural (Tabela 19), confirma também que, apesar de ter havido diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre os valores médios em uma data experimental (63º Dia pós monta natural), estes valores não diferiram estatisticamente das médias apresentadas em outras datas, dentro do mesmo grupo, o que comprova ausência de alteração clínica significativa nas fêmeas ao longo de todo o período.

Tabela 19. Resultados das comparações múltiplas, aferidos em uma análise de variância em parcela subdividida, do parâmetro freqüência respiratória (mpm) de cabras cobertas naturalmente por reprodutores não inoculado (GIII – Controle) e inoculados experimentalmente com 2,5 x 10^5 oocistos (GI) e 1 x 10^6 taquizoítos (GII) de *Toxoplasma gondii.*

Dias pré e pós-monta natural	Grupos Experimentais / Frequências respiratórias médias[1] e desvios padrões			DTP*	
	Cabras cobertas pelo macho inoculado com oocistos (GI)	Cabras cobertas pelo macho inoculado com taquizoítos (GII)	Cabras cobertas pelo macho não inoculado (GIII - Controle)	Valor de F	Pr > F
-1	36,80 ± 5,22 Aa	38,40 ± 5,37 Aa	38,00 ± 2,83 Aa	0,16	0,857
3	39,20 ± 9,12 Aa	36,00 ± 7,48 Aa	30,00 ± 2,83 Aa	1	0,406
6	35,20 ± 3,35 Aa	37,60 ± 5,37 Aa	36,00 ± 11,31 Aa	0,22	0,806
9	37,60 ± 6,07 Aa	49,60 ± 16,15 Aa	38,00 ± 8,49 Aa	1,35	0,306
11	40,00 ± 5,66 Aa	36,40 ± 6,69 Aa	40,00 ± 11,31 Aa	0,39	0,685
14	44,80 ± 10,35 Aa	41,60 ± 2,19 Aa	48,00 ± 5,66 Aa	0,54	0,599
21	36,80 ± 8,67 Aa	36,80 ± 5,22 Aa	36,00 ± 11,31 Aa	0,03	0,974
28	40,00 ± 9,38 Aa	41,20 ± 6,87 Aa	38,00 ± 8,49 Aa	0,11	0,893
35	42,40 ± 6,07 Aa	40,80 ± 5,93 Aa	44,00 ± 0,00 Aa	0,28	0,765
42	36,00 ± 5,66 Aa	40,80 ± 7,16 Aa	30,00 ± 2,83 Aa	2,56	0,131
49	36,00 ± 7,48 Aa	35,20 ± 3,35 Aa	42,00 ± 2,83 Aa	1,09	0,375
56	40,80 ± 3,35 Aa	42,40 ± 8,29 Aa	44,00 ± 0,00 Aa	0,21	0,817
63	35,20 ± 7,16 Ba	44,80 ± 1,79 ABa	40,00 ± 5,66 Aa	4,63	0,041
70	38,40 ± 7,27 Aa	42,40 ± 5,37 Aa	37,00 ± 1,41 Aa	0,85	0,46
77	37,60 ± 5,37 Aa	44,00 ± 12,00 Aa	38,00 ± 8,49 Aa	0,63	0,55
84	41,60 ± 4,56 Aa	47,20 ± 7,69 Aa	46,00 ± 8,49 Aa	0,86	0,453
91	36,80 ± 4,38 Aa	43,20 ± 8,67 Aa	32,00 ± 0,00 Aa	2,88	0,107
98	39,20 ± 5,93 Aa	39,20 ± 10,35 Aa	40,00 ± 5,66 Aa	0,03	0,968
105	40,00 ± 7,48 Aa	44,00 ± 7,30 Aa	38,00 ± 14,14 Aa	0,48	0,635
112	42,80 ± 12,30 Aa	39,00 ± 3,83 Aa	34,00 ± 2,83 Aa	0,64	0,552
119	41,60 ± 7,80 Aa	41,33 ± 6,11 Aa	38,00 ± 2,83 Aa	0,18	0,842
126	39,20 ± 5,22 Aa	42,67 ± 4,62 Aa	38,00 ± 2,83 Aa	0,68	0,536
133	40,80 ± 7,16 Aa	40,00 ± 11,31 Aa	32,00 ± 5,66 Aa	1,04	0,409
140	39,20 ± 7,16 Aa	40,00 ± 5,66 Aa	42,00 ± 8,49 Aa	0,11	0,9
147	36,00 ± 0,00 Aa	- - -	40,00 ± 5,66 Aa	1,8	0,272
DDT**	Valor de F 0,62	1,03	1,21		
	Pr > F 0,909	0,433	0,254		

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

* Desdobramento dos tratamentos dentro de cada dia

** Desdobramento dos dias dentro de cada tratamento

4.7.2 - Ocorrências clínicas

Das doze fêmeas, três (cabras 1003, 1032 e 1013), cobertas pelo macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii,* apresentaram intercorrências no processo gestacional . A cabra 1003, coberta aos 21 dias pós-inoculação (DPI) do macho, apresentou episódio de aborto (dois fetos natimortos) aos 115 dias do período gestacional; a cabra 1032, coberta aos 28 DPI do macho, apresentou episódio de aborto (um feto natimorto – Figura 25 no anexo**)** aos 100 dias de gestação, a cabra 1013, coberta aos 70 DPI do macho, pariu aos 128 dias do período gestacional, dois prematuros, que vieram a óbito decorridas 24 horas. Imediatamente após a ocorrência destas anormalidades reprodutivas, as fêmeas, assim como os "produtos" das respectivas gestações foram eutanasiados para a colheita de tecidos para pesquisa de *T. gondii*, por meio da bioprova e PCR. As fêmeas do grupo controle (Figura 24), como era esperado, apresentaram gestação normal, com produção de crias viáveis, os quais, juntamente com as respectivas reprodutoras, foram eutanasiados também para a pesquisa de parasitismo toxoplásmico. Nas demais fêmeas e em seus respectivos filhotes, não foram observadas quaisquer alterações gestacionais que pudessem ser atribuídas ao parasitismo por *T. gondii*.

4.7.3 - Determinação da parasitemia

Surtos parasitêmicos foram pesquisados, conforme descrito no item 3.7.2 , de forma indireta, pela sorologia dos camundongos inoculados com as amostras sanguíneas colhidas das fêmeas caprinas, nas diferentes datas experimentais,

sendo consideradas positivas as amostras de soro, dos camundongos inoculados. Nos camundongos que apresentavam títulos sorológicos ≥ 1:64, realizou-se também, a confirmação da presença de cistos teciduais nos encéfalos dos mesmos. Desta forma, surtos parasitêmicos foram detectados em seis ocasiões, em duas fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 2×10^5 oocistos de *T. gondii* e em sete ocasiões, em quatro fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 1×10^6 taquizoítos (Tabela 20).

Tabela 20. Surtos parasitêmicos em fêmeas caprinas cobertas por machos inoculados com *Toxoplasma gondii* e não inoculado (Controle)

Grupos	Nº/Cabra	Parasitemia / Dias pós cobertura																										
		-14	-7	-1	1	3	6	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147
I	1031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	1048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nr
	1055	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1064	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nr
II	1003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	nr[1]				
	1013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	nr[2]		
	1032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nr[1]						
	1040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nr
	1088	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nr
III	1042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nr
	1012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nr

I: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 2×10^5 oocistos, II: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 1×10^6 taquizoitos, III- Fêmeas cobertas pelo macho controle,
- : RIFI para *Toxoplasma gondii* negativa (< 1:64)
RIFI para *Toxoplasma gondii* positiva (≥ 1:64) em camundongos inoculados - Confirmação pela presença de cistos cerebrais
nr – Data experimental não realizada – Parto viável e posteriormente eutanásia das fêmeas e eventuais produtos
nr[1]: Aborto
nr[2]: Nascimento de prematuros fracos que posteriormente vieram a óbito

4.7.4 - Resposta imune humoral (ELISA - teste)

Os resultados sorológicos das fêmeas experimentais, nos períodos pré e pós – coberturas, obtidos pelo método de ELISA indireto estão expressos Tabela 21.

Tabela 21: Valores de densidade óptica (DO) e resultados (+/-), obtidos por meio da técnica do Elisa Indireto de soros de cabras cobertas pelos machos inoculados com *Toxoplasma gondii* e não inoculado (Controle)

Dias Pós Cobertura / Densidade ótica / Resultado Sorológico (ELISA teste)																								
	GRUPO I										GRUPO II										GRUPO III			
Dia Pós	Animal 1031		Animal 1048		Animal 1055		Animal 1064		Animal 1077		Animal 1003		Animal 1013		Animal 1032		Animal 1040		Animal 1088		Animal 1012		Animal 1042	
Cobertura	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa	D.O	Elisa
-14	0,171	-	0,182	-	0,283	-	0,198	-	0,267	-	0,270	-	0,085	-	0,114	-	0,246	-	0,184	-	0,188	-	0,167	-
-7	0,198	-	0,198	-	0,205	-	0,187	-	0,249	-	0,260	-	0,090	-	0,091	-	0,239	-	0,269	-	0,176	-	0,228	-
-1	0,252	-	0,187	-	0,240	-	0,204	-	0,260	-	0,250	-	0,112	-	0,093	-	0,267	-	0,228	-	0,197	-	0,250	-
+3	0,144	-	0,205	-	0,257	-	0,216	-	0,220	-	0,237	-	0,154	-	0,098	-	0,249	-	0,267	-	0,202	-	0,223	-
+6	0,302	+	0,797	+	0,327	+	0,271	-	0,265	-	0,265	-	0,153	-	0,100	-	0,582	+	0,249	-	0,227	-	0,280	-
+9	0,299	+	0,815	+	0,343	+	0,385	+	0,270	-	0,346	+	0,145	-	0,125	-	0,555	+	0,268	-	0,243	-	0,202	-
+11	0,329	+	0,751	+	0,306	+	0,400	+	0,251	-	0,297	+	0,165	-	0,288	+	0,557	+	0,254	-	0,234	-	0,145	-
+14	0,904	+	1,098	+	0,322	+	0,411	+	0,306	+	0,305	+	0,305	+	0,290	+	0,549	+	0,351	+	0,242	-	0,207	-
+21	0,440	+	0,764	+	0,240	-	0,508	+	0,285	+	0,342	+	0,412	+	0,345	+	0,536	+	0,257	-	0,242	-	0,255	-
+28	0,362	+	0,728	+	0,231	-	0,548	+	0,299	+	0,342	+	0,339	+	0,389	+	0,535	+	0,235	-	0,228	-	0,190	-
+35	0,190	-	0,734	+	0,295	+	0,339	+	0,484	+	0,315	+	0,556	+	0,408	+	0,556	+	0,265	-	0,246	-	0,240	-
+42	0,267	-	0,070	-	0,321	+	0,651	+	0,415	+	0,293	+	0,408	+	0,354	+	0,564	+	0,243	-	0,241	-	0,256	-
+49	0,232	-	0,804	+	0,357	+	0,556	+	0,306	+	0,256	-	0,398	+	0,347	+	0,563	+	0,293	+	0,242	-	0,261	-
+56	0,219	-	0,728	+	0,389	+	0,440	+	0,308	+	0,302	+	0,389	+	0,349	+	0,479	+	0,424	+	0,229	-	0,220	-
+63	0,219	-	0,702	+	0,299	+	0,299	+	0,362	+	0,515	+	0,325	+	0,402	+	0,542	+	0,262	-	0,220	-	0,178	-
+70	0,301	+	0,743	+	0,289	+	0,362	+	0,346	+	0,565	+	0,336	+	0,339	+	0,650	+	0,292	-	0,244	-	0,190	-
+77	0,232	-	0,580	+	0,304	+	0,378	+	0,378	+	0,626	+	0,302	+	0,358	+	0,774	+	0,316	+	0,223	-	0,215	-
+84	0,230	-	0,560	+	0,301	+	0,389	+	0,358	+	0,519	+	0,376	+	0,349	+	0,706	+	0,295	+	0,241	-	0,245	-
+91	0,177	-	0,414	+	0,305	+	0,405	+	0,320	+	0,477	+	0,397	+	0,371	+	0,392	+	0,271	-	0,232	-	0,229	-
+98	0,178	-	0,389	+	0,317	+	0,314	+	0,360	+	0,421	+	0,417	+	0,367	+	0,366	+	0,229	-	0,215	-	0,211	-
+105	1,887	+	0,514	+	0,347	+	0,291	+	0,263	-	0,278	-	0,428	+	nr[1]		0,367	+	0,257	-	0,207	-	0,193	-
+112	0,203	-	0,394	+	0,298	+	0,334	+	0,252	-	0,403	+	0,477	+			0,339	+	0,245	-	0,190	-	0,204	-
+119	0,148	-	0,067	-	0,321	+	0,203	-	0,182	-	nr[1]		0,403	+			0,427	+	0,236	-	0,189	-	0,164	-
+126	0,151	-	0,344	+	0,332	+	0,186	-	0,208	-			0,393	+			0,365	+	0,249	-	0,183	-	0,154	-
+133	0,250	-	0,337	+	0,276	-	0,241	-	0,293	+			nr[2]				0,486	+	0,231	-	0,180	-	0,171	-
+140	0,148	-	0,346	+	0,196	-	0,255	-	0,259	-							0,439	+	0,215	-	0,178	-	0,175	-
+147	0,159	-	nr		0,170	-	0,183	-	nr								nr		nr		0,198	-	0,160	-

Grupo I– Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 2x 10^5 oocistos, Grupo II - Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoíto e Grupo III - Fêmeas cobertas pelo macho controle.
(+) Amostra positiva considerando o "cut off" da densidade óptica > 0,287
(-) Amostra negativa considerando o "cut off" da densidade óptica < 0,287
nr – Data experimental não realizada – Parto viável e posteriormente eutanásia da fêmea e eventuais produtos
nr[1]: Aborto
nr[2]: Nascimento de prematuros fracos que posteriormente vieram a óbito

4.7.5 Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos tecidos das fêmeas e em seus "produtos"

Ao final do período gestacional ou posteriormente à ocorrência de qualquer eventualidade, como aborto, as fêmeas foram necropsiadas para colheitas de amostras teciduais destinadas a pesquisa de *T. gondii* por meio da imunohistoquímica, do bioensaio e pela técnica de PCR. Tais procedimentos também foram realizados nos "produtos" resultantes das gestações das cabras experimentais.

4.7.5.1 Imunohistoquímica

Das 10 cabras (GI e GII) cobertas naturalmente pelos machos reprodutores infectados por *T. gondii* (A e B) nove apresentaram resultados positivos para *T. gondii*, em pelo menos uma amostra tecidual, quando avaliadas pela imunohistoquímica. Estes resultados estão sumariados na Tabela 22, e alguns deles ilustrados nas Figuras 26 e 27. Nenhuma imunomarcação sugestiva do parasitismo toxoplásmico foi observada nas cabras pertencentes ao grupo III (controle).

Tabela 22: Identificação de *Toxoplasma gondii* por meio da imunomarcação, em tecidos reprodutivos das fêmeas caprinas, utilizando o método da imunohistoquímica.

Grupos	Nº/Cabra	Amostras teciduais das fêmeas experimentais/ Imunohistoquímica							
		Cérebro	Fígado	M. Esquelética	M. Cardíaca	Baço	Ovário	Ùtero	Vagina
I	1031	-	-	-	-	-	-	+	-
	1048	+	-	+	-	+	-	+	-
	1055	+	-	-	-	-	-	-	-
	1064	-	+	+	-	-	-	-	-
	1077	-	-	-	-	-	-	-	-
II	1003	+	+	-	-	-	+	-	-
	1013	+	-	+	-	-	-	+	+
	1032	+	+	-	+	-	+	+	+
	1040	+	-	+	-	-		-	-
	1088	-	-	-	+	+	+	+	
III	1012	-	-	-	-	-	-	-	-
	1042	-	-	-	-	-	-	-	-

I: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com oocistos, II: Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com taquizoitos, III- Fêmeas cobertas pelo macho controle,
- : Amostra tecidual com imunomarcação negativa
+ : Amostra tecidual com imunomarcação positiva

4.7.5.2 Bioensaio em camundongos

Os resultados do bioensaio em camundongo dos diferentes tecidos colhidos das fêmeas experimentais e de seus respectivos “produtos” encontram-se sumariados na Tabela 23.

Tabela23 . Presença de *Toxoplasma gondii* nos tecidos reprodutivos das fêmeas caprinas e dos respectivos "produtos" da gestação, diagnosticado por meio do bioensaio em camundongos.

Grupos	Nº/Cabra	Amostras teciduais/ Resultados do bioensaio em camundongos												
		Fêmea experimental								"Produtos" da Gestação				
		Cérebro	Fígado	M. Esquelética	M. Cardíaca	Baço	Ovário	Ùtero	Vagina	Placenta	Cérebro	M. Cardíaca	Fígado	Baço
I	1031	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
	1048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1055	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
	1064	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
	1077	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	+
II	1003	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
	1013	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	1032	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1040	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1088	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
III	1012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I – Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 2x 10^5 oocistos, II - Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoíto e III – Fêmeas cobertas pelo macho não inoculado (Controle).
- : Amostra tecidual negativa na Bioprova (< 1:64)
+: Amostra tecidual positiva na Bioprova (≥ 1:64)- confirmação pela presença de cistos cerebrais

4.7.5.3 Pesquisa do DNA de *T. gondii* pela PCR

Os resultados referentes à presença ou ausência do DNA de *T. gondii* nas amostras teciduais das fêmeas experimentais e respectivos “produtos” após avaliação dos materiais amplificados e processados em gel de agarose na eletroforese estão registrados na Tabela 24 e ilustrados nas Figuras 12 a 20 e 23.

Tabela 24. Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* nos tecidos reprodutivos das fêmeas caprinas cobertas pelos machos reprodutores em seus respectivos "produtos" gestacionais, por meio da PCR.

Grupos	Nº/Cabra	Amostras teciduais/ Resultado da PCR												
		Fêmea experimental								Produtos da Gestação				
		Cérebro	Fígado	M. Esquelética	M. Cardíaca	Baço	Ovário	Ùtero	Vagina	Placenta	Cérebro	M. Cardíaca	Fígado	Baço
I	1031	+	+	+	+	+	+	+	+	nr	+	+	+	+
	1048	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1055	+	+	+	+	+	nr	+	+	+	+	+	+	+
	1064	+	+	+	+	-	nr	+	+	nr	+	+	+	+
	1077	+	+	+	+	nr	nr	+	-	nr	nr	+	+	+
II	1003	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nr	+	+	+
	1032	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1040	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	1088	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
III	1012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I–Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 2x 10^5 oocistos, II-Fêmeas cobertas pelo macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoíto e III-Fêmeas cobertas pelo macho não inoculado (Controle).

- : Amostra tecidual negativa na PCR

+ : Amostra tecidual positiva quanto a presença de material genético de *Toxoplasma gondii* na PCR .

nr : amostra tecidual não avaliada pela PCR

5. - DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de oocistos e seleção dos caprinos

A metodologia utilizada para a obtenção dos inóculos utilizados na presente pesquisa, confirma os achados até então encontrados na literatura consultada quanto à biologia do *Toxoplasma gondii* (FRENKEL *et al*. (1970), COSTA *et al*. (1977), VIDOTTO & COSTA (1987), KANETO *et al*., (1997). Obteve-se uma elevada produção de taquizoítos (Cepa RH) e de oocistos (Cepa P), demonstrando que este parasito perpetua-se com facilidade nos hospedeiros e no meio ambiente.

No processo de seleção dos caprinos foi possível identificar cinco machos (50%), de um total de 10 animais avaliados e 33 fêmeas (20,1%), de um total de 164 examinadas, positivos para *T. gondii*, sorologia confirmada por meio da RIFI. Por estes resultados verifica-se alta prevalência desta parasitose na região estudada. Fatores como idade dos animais, condições das instalações (KAMINI et al 2010) e localização das criações em regiões de clima quente e úmido (KAMINI *et al*, 2010 e IVANA *et al*, 2006) são determinantes para a prevalência de anticorpos contra o *T. gondii* em rebanhos caprinos.

Os exames clínicos e sorológicos, realizados no período pré e pós-inoculação dos machos e pré e pós-monta natural das fêmeas confirmam a sanidade dos animais não só quanto à toxoplasmose, como também quanto à leptospirose, neosporose e brucelose, enfermidades estas que poderiam influenciar nos resultados obtidos.

5.2. Machos experimentais

Segundo a literatura a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é aceita como um dos principais métodos de diagnóstico de infecção toxoplásmica em diversas espécies animais e também em humanos, por ser considerada de fácil execução e alta sensibilidade (CAMARGO, 1964). Utilizando-se esta técnica, confirmou-se a infecção toxoplásmica, após a inoculação de 1 x 10^6 taquizoítos (B) e 2 x 10^5 oocistos (A) de *T. gondii,* pela soroconversão no 14º e no 28º DPI, respectivamente (Tabela 6). Esta precocidade na resposta humoral foi também detectada por SANTANA *et al* (2010), que relataram soroconversão no 11º DPI para caprinos machos inoculados com 1 x 10^6 taquizoítos, assim como naqueles que receberam 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii*.

Situação semelhante foi, também, descrita por NISHI *et al*.(2001), no 10° DPI, tanto na RIFI como no Teste de Aglutinação em Látex. CHHABRA *et al* (1982) detectaram anticorpos circulantes em caprinos infectados com oocistos no 15° DPI, utilizando-se do teste de Hemoaglutinação Indireta. Inoculando taquizoítos de *T. gondii,* via subcutânea, VITOR *et al* (1999) diagnosticaram anticorpos circulantes, em caprinos, no 5° DPI pelo ELISA teste e pela Hemoaglutinação Indireta. Segundo NISHI *et al* (2001), diferenças no tipo de inóculo, assim como a via de infecção, podem influenciar a dinâmica da resposta humoral do hospedeiro.

MONTOYA *et al* (2009) relataram que anticorpos da classe IgG não são revelados por testes sorológicos antes de duas semanas após a infecção. A curva de IgG observada neste trabalho (Tabela 6) teve seu início a partir do 14º DPI no

caprino B inoculado com taquizoítos (título de 1:1024). O título máximo (1:4096) persistiu do 21º ao 42º DPI. Para o animal inoculado com 2 x 10^5 oocistos (A), a curva de IgG iniciou no 28ºDPI (título de 1:2048), atingindo o máximo, também de 1:4096 no 35ºDPI . Após este período, apesar destes animais permanecerem positivos pelo método da imunofluorescência (RIFI), ocorreu declínio dos valores sorológicos, possivelmente em decorrência da resposta do organismo dos caprinos ao parasitismo por *T. gondii*. Segundo os autores supracitados, os valores dos títulos sorológicos podem não corresponder à severidade da doença, permanecendo os anticorpos em níveis elevados durante anos após a primo-infecção.

Estes resultados harmonizam-se com aqueles encontrados por NISHI *et at*. (2001) que detectaram títulos sorológicos máximos (RIFI) a partir do 35° DPI. Semelhantemente ao ocorrido no presente trabalho, tais autores observaram que os títulos sorológicos mantiveram-se também em niveis relativamente elevados até o 56° DPI. Esta persistência de altos níveis so rológicos (IgG) até o 70° DPI, observada no presente trabalho, pode ser justificada, conforme SHIRAHATA e SHIMIZU (1974) citados por DUBEY (1986), pelo fato destes anticorpos, relacionados à infecção crônica, apresentarem a capacidade de manterem-se "ativos", por longo período, quando comparado às imunoglobulinas da classe IgM, notadamente identificadas apenas até poucas semanas após infecção.

Quanto à avaliação estatística dos parâmetros clínicos (Tabela 5), pode-se verificar que apesar de ter havido diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre as temperaturas retais médias do caprino inoculado com 2 x 10^5

oocistos (A), em relação às do caprino inoculado com 1 x 10^6 taquizoíto (B) e do não inoculado (C), estes valores médios permaneceram dentro da faixa considerada de normalidade, deste parâmetro, nesta espécie animal (SMITH, 1993). Não houve, portanto, qualquer alteração na temperatura retal que pudesse ser atribuída à infecção toxoplásmica, diferentemente dos resultados obtidos por NISHI *et al* (2001), DUBEY & SHARMA (1980), CHHABRA *et al.* (1982) , DUBEY (1989) e SANTANA *et al* (2010), que relataram aumento da temperatura retal, sinal clínico dos mais evidentes, em caprinos inoculados com oocistos de *T. gondii*. DUBEY (1989) descreve situação um pouco mais severa com a ocorrência de óbito de um animal, com dois a três meses de vida, inoculado com oocistos. Apesar da diferença de inoculo utilizada (quantidade e cepa) e da idade dos animais, NISHI *et al* (2001) constataram ocorrência de episódios de hipertermia, anorexia e letargia do 3° ao 7° DPI, em todos os an imais inoculados com *T. gondii*. SANTANA *et al* (2010) descreveram ocorrência de discreta hipertermia (5ºDPI) em caprinos machos adultos inoculados com a mesma quantidade de oocistos também pertencentes à cepa P do referido protozoário.

Em relação ao parâmetro freqüência cardíaca (Tabela 5), observou-se ausência de diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os valores médios aferidos dos três machos. Por outro lado, em relação à freqüência respiratória (Tabela 5), detectou-se a ocorrência de diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre as médias aferidas do macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos (A) e do reprodutor não inoculado (C). Possivelmente esta alteração de comportamento foi desencadeada pelo estresse decorrente dos exames

efetuados. Comprova esta inferência, os elevados valores individuais do número de movimentos respiratórios por minuto (mpm) aferidos no 56º e 63º DPI, o que certamente contribuiu para o aumento do valor médio deste parâmetro. Estes achados referentes às freqüências respiratória e cardíaca estão de acordo com os achados de SANTANA *et al* (2010), que não encontraram quaisquer alterações, nestes parâmetros, sugestivas da infecção toxoplásmica, em caprinos experimentalmente infectados.

Determinadas divergências ocorridas nos resultados referentes aos parâmetros clínicos aferidos, quando comparados aos obtidos por NISHI *et al* (2001), DUBEY & SHARMA (1980), CHHABRA *et al.* (1982) , DUBEY (1989), podem ser justificadas, segundo DUBEY (1985), pelas diferenças de faixas etárias dos animais utilizados no presente estudo (acima de 12 meses). Deve-se ressaltar que os autores supracitados utilizaram animais jovens (menos de 12 meses), comprovando, mais uma vez, maior susceptibilidade de animais jovens à infecção, além de estar relacionada à patogenicidade da cepa e à dose do inóculo utilizado.

A avaliação espermática, ou espermograma, é largamente utilizada no manejo reprodutivo de diversas espécies animais e considerada de extrema importância para o monitoramento de animais reprodutores. Comparada com outras espécies animais, menor atenção é dada à fisiologia da reprodução em caprinos machos (GORDON, 1997). Variações no peso testicular, produção de sêmen, atividade e fertilidade estudadas por vários pesquisadores (SONHA & SINGH, 1982; GREYLING & GROBBELAAR, 1983; PANDEY *et al*., 1985; HIBBERT *et al*., 1986; OKERE *et al*., 1986; CHEMINEAU *et al*., 1987; AL-HAZAB

and BASIOUNI, 1988; ROCA *et al*., 1992a, b; AHMED *et al*., 1997; MARTEMUCCI *et al*., 1998; KARAGIANNIDIS *et al*., 2000; AL-GRALBAN *et al*,, 2004). Entretanto, ainda há certa carência de estudos sobre aspectos reprodutivos de caprinos portadores de infecção toxoplásmica.

Analisando os resultados referentes às avaliações espermáticas realizadas nos caprinos, observa-se ausência de alterações nos cinco parâmetros espermáticos mensurados (volume, motilidade, vigor, alterações morfológicas e concentração), que pudesse ser atribuída ao *T. gondii*. Confirma esta inferência, a ausência de diferença estatística significativa (P > 0,05) entre os valores médios obtidos do reprodutor não inoculado e os dos inoculados.

Segundo HAFEZ & HAFEZ (2004) e NUNES (2002) o volume de sêmen produzido por um caprino pode variar de 0,1 a 2 ml. COELHO *et al*., (2006), KARAGIANNIDIS *et al*., (2000); MIYAMOTO *et al*.(1987) e DELGADILLO *et al*. (1992) afirmam que quanto maior o perímetro escrotal , maior o número de células de Leydig e maior a produção de testosterona, resultando, assim, em maior desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias e, conseqüentemente, aumento na produção de plasma seminal e do volume ejaculado. Os valores médios de volume seminal ejaculado pelos três caprinos experimentais não diferem (P > 0,05) estatisticamente entre si e estão dentro da faixa considerada de normalidade para esta espécie animal.

O vigor espermático, o qual representa a força do movimento que influencia na velocidade dos espermatozóides, é classificado de zero a cinco, onde zero é ausência de movimento progressivo com deslocamento de cauda lateral fraco e

inexpressivo e cinco resulta em movimento vigoroso e veloz dos espermatozóides, geralmente progressivo (CBRA, 1998). Este parâmetro, como pode ser visualizado na Tabela 8, apresentou-se uniforme nos caprinos, não diferindo estatisticamente ($P > 0,05$) entre si. COELHO *et al.* (2006) analisando caprinos machos da raça Saanen e Alpina, isentos de enfermidades, mantidos em condições de termo-neutralidade, obtiveram média de 3,5 ± 0,6 para o vigor espermático, valores estes semelhantes aos obtidos nos machos da presente pesquisa.

Outro parâmetro avaliado no espermiograma foram as alterações morfológicas que consiste na proporção de espermatozóides com ausência de cauda, cauda dupla, cabeça dupla e outros. Dentro da população espermática, estas alterações morfológicas não devem ultrapassar 15%, segundo NUNES (2002). Segundo HENKEL *et al*. (2005), este valor está significativamente correlacionado com a motilidade espermática e com a habilidade do espermatozóide em se ligar à zona pelúcida na fertilização do óvulo. Os resultados apresentados, para este parâmetro, na presente pesquisa, revelam discreta ocorrência de anomalias espermáticas nos três caprinos. Entretanto, tais valores podem ser considerados aceitáveis e não diferiram estatisticamente, quando comparados entre caprino não infectado e infectado. Desta forma, a similaridade entre os valores encontrados para as alterações morfológicas espermáticas reforçam a inexistência também de alterações na motilidade espermática dos caprinos experimentais.

Segundo HAFEZ & HAFEZ (2004) a concentração espermática em caprinos adultos pode variar de 20×10^8 a 60×10^8 espermatozóides /ml. Foi possível

observar, no entanto, que o caprino inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* apresentou média de concentração de 16,84 x 10^8 (espermatozóides/ml), concentração esta abaixo daquela aceita como mínima para esta espécie animal. A possível justificativa para esta situação baseia-se no fato de que o uso do eletro-ejaculador como metodologia de colheita aumenta o volume do ejaculado e, conseqüentemente, diminui a concentração espermática, pelo fato de estimular as glândulas acessórias responsáveis pela produção do fluido seminal.

No primeiro relato sobre isolamento de *T.gondii* no sêmen, encontrado na literatura, DISKO *et al*(1971) identificaram a presença do coccídio em amostras seminais de três homens portadores de infecção toxoplásmica natural, dentre 125 pacientes participantes da avaliação. Posteriormente, SPENCE *et al*. (1978), TEALE *et al*. (1982) e AGANGA *et al*. (1988) pesquisando amostras seminais de ovinos, DUBEY e SHARMA (1980) e SANTANA *et al* (2010) de caprinos, SCARPELLI (2001) de bovinos, MOURA (2004) de suínos e ARANTES *et al*. (2009) em cães, obtiveram resultados positivos, utilizando animais experimentalmente infectados, ou seja, isolaram *T. gondii* nos ejaculados colhidos.

DUBEY e SHARMA (1980) demonstraram pela bioprova em camundongo, presença de *T.gondii* no sêmen de três caprinos inoculados, por via oral, com 10^4 oocistos da cepa GT-1 (isolada de caprinos). Na pesquisa realizada por estes autores, o protozoário foi identificado no 7° DPI em amostras seminais de dois caprinos, e no 12° DPI do terceiro caprino experimental. Nas amostras seminais de um dos animais foi possível identificar a excreção de *T. gondii* até o 59° DPI.

Os resultados obtidos por SANTANA *et al.* (2010) em caprinos inoculados com oocistos e taquizoítos de *T. gondii* foram similares aos do presente estudo, sendo possível a identificação do referido protozoário em várias datas, por meio do bioensaio em camundongos como também pela PCR. No presente trabalho, pela bioprova (Tabela 9), isolou-se *T. gondii* em ejaculados do caprino (A) inoculado com oocistos no 21º, 28º e 56º DPI. No reprodutor que recebeu taquizoítos (B), a presença do parasito também foi detectada no 7º, 9º, 21º, 28º, 49º e 70º DPI. Utilizando da técnica da PCR (Tabela 10), foi possível detectar o DNA de *T. gondii* no sêmen do animal inoculado com oocistos em todas as datas de avaliação e em 12 das 15 datas pós-inoculação (5º, 7º, 9º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º, 56º, 63º, 70º) no sêmen do caprino inoculado com taquizoítos (B). Como era de se esperar, não foi possível, em nenhuma data, identificar ou isolar o referido protozoário nas amostras seminais do caprino não inoculado (C), tanto pela técnica do bioensaio quanto pela PCR.

Os resultados de todos autores anteriormente citados e os do presente estudo, reforçam o conceito de que a PCR funciona como importante ferramenta no diagnóstico da infecção toxoplásmica.

Especificamente, no presente trabalho, foi amplificado um segmento de 194 bps do gene B_1 de *T. gondii*. Embora outras seqüências do DNA de *T. gondii* também possam ser utilizadas como alvo de amplificação (P30, TGR1E ou segmento do gene 18S r RNA) pela PCR ou “nested” PCR, o gene B_1 foi escolhido por ser amplamente conservado nos vários isolados analisados e por estar presente em pelo menos 35 locus do genoma do *T. gondii* (FUENTES *et al*.,

1996). Entretanto, recentemente um fragmento do DNA de *T. gondii* de 529 bps, que se repete entre 200 a 300 vezes no genoma do parasito, foi identificado e testado para o desenvolvimento de uma PCR com fins diagnósticos, inclusive quantitativos, o que possivelmente amplia a sensibilidade deste teste. Este fragmento apresentou sensibilidade variando de idêntica a até 10 vezes mais eficiente, dependendo do tipo de material, quando comparado com os resultados da PCR empregando-se o gene B_1 (HOMAN *et al*., 2000). Porém, o gene B_1 tem seu uso mais difundido na pesquisa do *T. gondii* a partir de diversos tecidos/fluídos.

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

Pela imunohistoquímica foi possível identificar a presença direta do referido protozoário na próstata e vesícula seminal do macho inoculado com 2×10^5

oocistos (A), assim como no testículo, epidídimo e próstata do macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos (B). Estes resultados assemelham-se aos obtidos por MOURA (2004) em suínos, que detectou o parasito, por esta mesma técnica, em amostras de epidídimos colhidos de animais inoculados com oocistos ou com taquizoítos. Além disso, este mesmo autor verificou, também, resultado positivo em amostras de vesícula seminal dos animais inoculados com taquizoítos da cepa "RH". Semelhantemente, ARANTES (2005) obteve resultados semelhantes em cães, encontrando imunoreatividade ao *T. gondii* em amostras de testículos e epidídimos dos animais inoculados com oocistos ou taquizoítos.

Nas metodologias do bioensaio em camundongos, assim como na PCR dos tecidos reprodutivos dos machos experimentais foi possível, também, isolar *T. gondii*, assim como feito por SANTANA *et al*. (2010), comprovando parasitismo tecidual em algumas das amostras de testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal.

Nas amostras teciduais do aparelho reprodutor do macho não inoculado (C - controle), como esperado, não foi possível identificar pelas três técnicas anteriores, a presença do protozoário, comprovando que este manteve-se livre da infecação toxoplásmica ao longo de todo o período experimental.

Ressalta-se que, além de ter sido identificado a soroconversão por meio da RIFI dos animais inoculados (caprinos A e B), e isolado o referido protozoário em várias amostras teciduais, pertencentes a estes dois machos, por meio da imunohistoquímica (Tabela 11), do bioensaio em camundongo (Tabela 12) e

também da PCR (Tabela 13), foi possível também, identificar a excreção do *T. gondii* em várias amostras seminais dos caprinos inoculados experimentalmente.

5.3. Fêmeas experimentais e filhotes

Pela análise da Tabela 15 é possível notar que o grupo de fêmeas (GI) cobertas pelo macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos (A) apresentou médias de temperaturas retais similares em todas as avaliaçãoes, não diferindo significativamente ($P > 0,05$) da média apresentada na data anterior à monta natural (-1), situação em que certamente os animais estavam livres da infecção parasitária. O grupo de fêmeas (GII) cobertas pelo macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos (B) apresentou relativa queda no valor médio das temperaturas retais aferidas ao 98º dia pós monta natural, chegando ao valor médio de 38,6ºC, diferindo significativamente ($P \leq 0,05$) dos demais valores médios aferidos, destas mesmas fêmeas, nas demais observações. O grupo de fêmeas (GIII) cobertas pelo macho não inocualdo (C) também revelou relativa queda nos valores médios das temperaturas retais aferidas em duas datas pós monta natural (28º e 35º) alcançando valores de 38,6 e 38,7 respectivamente, os quais diferiram significativamente dos valores aferidos na data anterior à monta natural (-1). Outra situação de grande interesse foi a detecção de diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$), entre os valores médios das temperaturas retais, entre os grupos no 56º, 70º e 119º DPMN. Ressalta-se que, embora tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os valores médios de temperaturas retais das fêmeas caprinas em algumas das ocasiões acima mencionadas, é possível

esclarecer que, segundo SMITH (1993), estes valores ainda encontram-se dentro da faixa de normalidade para esta espécie doméstica, a qual oscila, em condições de normotermia, entre 38,0ºC e 40,5º C.

Pela análise das Tabelas 17 e 19 é possível notar não ter havido diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os valores médios aferidos das freqüências cardíacas e respiratórias das cabras, em todas as datas experimentais, quando comparados aos valores médios aferidos na data anterior à monta natural (-1), dentro de cada um dos grupos e, além disso, segundo SMITH (1993), este parâmetro pode ocilar entre 70 e 120 bpm, na espécie caprina, em condições normais ou quanto estes animais são submetidos a leve atividade física ou movimentos, por exemplo pelo ato da coleta dos parâmetros clínicos.

No entanto, comparando-se os valores médios entre os grupos, nota-se a ocorrência de diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre os valores médios das freqüências cardíacas aferidos dos animais experimentais no 3º e 140º DPMN, em virtude da aferição de baixo valor médio no grupo de fêmeas (GIII) cobertas pelo macho não inoculado (C) (Tabela 17). Aos 63º DPMN, foi possível notar, como mostrado na Tabela 19, a ocorrência de diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre os valores médios da freqüência respiratória, aferidos nas cabras (GI) cobertas pelo macho inoculado com oocistos (A) quando comparados aos valores médios das cabras (GIII) cobertas pelo macho não inoculado (C). Tal situação atribui-se ao fato de ter sido aferida, nesta data, freqüências respiratórias individuais relativamente mais baixas em quase todos os animais. No entanto, apesar da diminuição dos movimentos respiratórios

médios, estes valores ainda encontram-se dentro da faixa de normalidade para esta espécie doméstica, que pode oscilar entre 20 e 45 mpm em condições normais, segundo SMITH (1993).

A infecção toxoplásmica das cinco cabras, via sêmen, após a monta natural pelos machos experimentalmente infectados com *T. gondii,* desencadeou resposta imunológica relativamente rápida, identificada por meio do ELISA (Tabela 21), com detecção de anticorpos IgG a partir do 6º DPMN. Ressalta-se que estas fêmeas foram monitoradas quanto à presença de anticorpos específicos contra *T. gondii,* desde o 30º dia que antecedeu a monta natural das mesmas, por caprinos macho não inoculado (C - controle), ou inoculados pelo protozoário (A-oocistos e B – taquizoítos). Embora tenha sido notada a persistência de positividade destas amostras, ao longo do período de avaliação foi possível notar também que em algumas datas pós monta natural, o Elisa mostrou resultados ditos falso negativos, o que demonstra certa restrição quanto ao uso desta metodologia como único meio de diagnóstico para esta enfermidade.

Esta persistência dos níveis de IgG, ao longo do período experimental, justifica-se pelo fato de que estas imunoglobulinas se mantém ativas por longo período, quando comparadas com as imunoglobulinas da classe IgM, notadamente identificadas apenas nas primeiras semanas após infecção (DUBEY, 1986).

No decorrer de todo o período, foi possível identificar a ocorrência de 13 surtos parasitêmicos nas fêmeas caprinas, identificados de forma indireta, por meio da soroconversão (RIFI) dos camundongos inoculados com camadas

leucocitárias das fêmeas caprinas colhidas pós monta natural. No grupo de fêmeas (GI) cobertas pelo macho inoculado com oocistos (A) foi possível identificar ocorrência de seis surtos parasitêmicos em duas cabras, como visualizado na Tabela 20. Estes surtos ocorreram aos 28º, 84º, 112º e 119º DPMN na fêmea 1031 e aos 14º e 28º DPMN na fêmea 1055. Situação semelhante ocorreu em quatro das cinco fêmeas (GII) cobertas pelo macho inoculado com taquizoítos (B). Neste grupo foram identificados surtos aos 105º DPMN na fêmea 1003, aos 119º e 126º DPMN na fêmea 1013, aos 42º, 77º, 91º DPMN na fêmea 1032 e aos 84º DPMN na fêmea 1040.

Em trabalhos realizados por CHHABRA *et al* (1982) e NISHI *et al* (2001), apesar da diferença entre as vias de infecção, os surtos parasitêmicos mostraram-se mais restritos à fase aguda da doença, ou seja, do 7° ao 14° DPI e do 5° ao 12° DPI, respectivamente. Em outro trabal ho, DUBEY *et al* (1980) observaram, em um caprino, parasitemia mais precoce (4° DPI). A elevada ocorrência de surtos parasitêmicos apresentada na presente pesquisa e nos trabalhos realizados por outros autores, pode ser justificada pela elevada susceptibilidade da espécie caprina ao *T. gondii*.

Três das cinco cabras (1003, 1013 e 1032) cobertas pelo caprino inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (B) apresentaram alterações gestacionais. A cabra 1003 abortou aos 115º DPMN situação esta, possivelmente associada ao surto parasitêmico identificado aos 105º DPMN. A cabra 1032, abortou aos 100ºDPMN o que pode, pelo menos a princípio, ser associado aos surtos parasitêmicos ocorridos aos 42º, 77º e 91º DPMN e, por fim, a cabra 1013,

que desenvolveu parto de dois cabritos prematuros aos 128º DPMN, os quais, um dia após nascimento, vieram a óbito. Esta situação de ocorrência de prematuros pode também ser atribuída ao surto parasitêmico ocorrido aos 119º e 126ºDPMN. No outro grupo (GI) foi possível notar a ocorrência do parto e um natimorto pertencente a cabra 1064, sem estar associado a ocorrência de surto parasitêmico detectável. Estes achados estão de acordo com os estudos publicados por MORAES *et al* (2010), os quais pesquisando fêmeas ovinas inseminadas com amostras seminais contendo diferentes inóculos de tauizoítos de *T. gondii* (cepa isolada em Guarapuava PR, Brasil), relataram a ocorrência de morte fetal e reabsorção embrionária precoce. Nas demais fêmeas que não abortaram nesta mesma pesquisa, observou-se a ocorrência de ovinos natimortos ou nascimento de animais fracos e que morreram horas depois do nascimento.

Associado a estas ocorrências, além da confirmação sorológica positiva destas quatro fêmeas, foi possível também identificar como positivas algumas de suas amostras teciduais e de seus respectivos produtos, por meio da imunohistoquímica (Tabela 22), do bioensaio em camundongo (Tabela 23), assim como da PCR (Tabela 24), o que sugere a participação do *T. gondii* como agente causador dos distúrbios gestacionais ocorridos.

Em um estudo realizado por STORMOEN *et al* (2010) com um rebanho caprino composto por 105 cabras que haviam passado por um surto de toxoplasmose, foi possível identificar que 70% delas apresentaram reabsorção fetal, abortamento ou pariram cabritos natimortos ou fracos. Segundo estes mesmos autores, os resultados das prenhezes como nascimento de produtos

viáveis, natimortos ou abortos, dependem do momento da gestação em que ocorre a infecção toxoplásmica. Embora haja na literatura relatos de alterações clínicas e distúrbios no processo gestacional em cabras com toxoplasmose, não há relatos de pesquisas feitas abordando o efeito da transmissão sexual deste agente, nesta espécie doméstica, o que impede uma discussão mais aprofundada do assunto.

As demais fêmeas pertencentes aos três grupos (GI, GII e GIII) desenvolveram períodos gestacionais normais, sem a ocorrência de qualquer alteração que pudesse ser atribuída ao parasitismo toxoplásmico.

Pelo método da imunohistoquímica (Tabela 22) foi encontrada imunoreatividade com identificação do *T. gondii* em algumas das amostras de cérebro, baço e útero do grupo de fêmeas (GI) cobertas pelo macho inoculado com oocistos (A). Além disso, imunoreatividade também foi encontrada em amostras de cérebro, fígado, musculatura cardíaca, baço, ovário e útero do grupo de fêmeas (GII) cobertas pelo caprino inoculado com taquizoítos (B).

Por meio do bioensaio em camundongos (Tabela 23) não foi possível identificar a presença do *T. gondii* apenas na musculatura cardíaca das fêmeas cobertas naturalmente pelo caprinho inoculado com 2×10^5 oocistos (GI). Nos demais tecidos selecionados para a pesquisa do parasito como cérebro, fígado, musculatura esquelética, baço, ovário, útero e vagina, foi possível o sucesso na identificação deste coccídeo pela presença de diversos cistos cerebrais contendo bradizoítos nos camundongos inoculados, demonstrando não só a ocorrência da transmissão sexual, como também, o grande poder de parasitismo nos tecidos das

fêmeas infectadas. Nos produtos oriundos das coberturas ocorridas neste grupo (GI), identificou-se a presença deste protozoário em grande parte dos tecidos pesquisados, tais como cérebro, musculatura cardíaca, fígado e baço, mostrando também a ocorrência da transmissão vertical desta parasitose.

Situação semelhante ocorreu no grupo de fêmeas cobertas pelo caprino inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (GII), em que o coccídeo não foi identificado por esta técnica, apenas nas amostras de baço colhidas das fêmeas, sendo identificado com sucesso nos demais tecidos pesquisados. Dos produtos oriundos das coberturas ocorridas neste grupo experimental (GII), identificou-se a presença do protozoário em amostras de placenta e musculatura cardíaca pelo bioensaio em camundongo, confirmando também a transmissão vertical

Pela PCR (Tabela 24), foi possível não apenas confirmar os achados da imunohistoquímica e do bioensaio, como também identificar outros tantos tecidos positivos quanto à presença do *T. gondii* das fêmeas caprinas e nos respectivos produtos oriundos das coberturas pelos machos inoculados. Situação semelhante foi encontrada por YAI *et al* (2003) que reportaram menor sensibilidade de identificação com o uso do bioensaio quando comparado à nested PCR em amostras teciduais de suínos. Também pela PCR, SREEKUMAR *et al* (2004) obtiveram sucesso na identificação de material genético do *T. gondii* nos tecidos pulmonares, musculatura esquelética e linfonodos mesentéricos de fêmeas caprinas inoculadas por via oral com oocistos assim como de feto abortado.

A PCR é a alternativa rápida, sensível e específica para a detecção do *T. gondii* (BURG *et al* 1989; HURTADO *et al* 2001). Além disso, as divergências

entre os resultados encontrados nas diferentes metodologias usadas podem, associar-se ao fato de que na PCR é possível detectar o material genético do protozoário em tecidos, mesmo que estes estejam em estado de decomposição, e, no entanto, a bioprova ao contrário, tem resultados satisfatórios apenas quando o protozoário ainda esteja em condições viáveis no tecido pesquisado (YAI *et al* 2003), situação esta que nem sempre favorável à pesquisa em tecidos.

Nota-se que na bioprova, na PCR assim como na imunohistoquímica, não foram encontradas positividade nos tecidos pertencentes às duas fêmeas (GIII) cobertas pelo macho não inoculado (C) assim como nos produtos destas coberturas naturais, resultados estes esperados, e que confirmam não ter havido qualquer contaminação ambiental que pudesse ter influenciado os resultados encontrados.

6. CONCLUSÕES

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

a) *T. gondii* pôde ser isolado no sêmen (bioprova e PCR), de reprodutores portadores de infecção toxoplásmica, nas mesmas datas em que ocorreram as montas naturais nas fêmeas.

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

c) Parasitismo tissular por *T. gondii* pôde ser diagnosticado nas fêmeas, por meio da imunohistoquímica, bioensaio em camundongos e PCR

d) A transmissão vertical de *T. gondii* pôde ser confirmada por meio do bioensaio em camundongos e pela PCR.

e) O diagnóstico de *T. gondii* no sêmen dos caprinos inoculados, a soroconversão dos machos e das fêmeas (RIFI e ELISA) e o isolamento deste coccídio (imunohistoquímica, bioensaio em camundongo e PCR) nas cabras e respectivos "produtos" resultantes das coberturas naturais, comprovam, pela primeira vez, que a infecção toxoplásmica pode ser transmitida sexualmente na espécie caprina.

7. REFERÊNCIAS

AGANGA, A. O.; UMOH, J. U.; KYEWALABYE, E. K.; EKWEMPU, C. C. Comparative experimental transmission studies with Nigerian isolates and TS-I strain of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal of Animal Production Research**, Zaria, v. 8, n. 2, p. 104-120, 1988.

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

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

AL-HAZAB, A.A.; BASIOUNI, G.F. Seasonal variation in semen quality of bucks indigenous to Saudi Arabia. **Pakistan Veterinary Journal**. 18, p 100-102, 1988

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

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.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: evidence for the transisson by sêmen in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 123, p190-194, 2009.

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

BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; MELO, L. S. S.; MELO, C. B. Perfil sanitário e zootécnico de rebanhos caprinos nas microrregiões do Cariri paraibano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, p. 1597-1600, 2007.

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

BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; SILVA, E. M. K.; MACEDO, Z. S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 43, n. 2, p. 116, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA; *J* CENEPI. **Boletim Epidemiológico**. Brasília, Centro Nacional de Epidemiologia, v. 8, n. 31, 1996.

BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; TONIOLLO, G.; LUVIZOTTO, M. C. R.; KANAMURA, C.; MORAES, F. R.; PERRI, S. H. V.; GENNARI, S. M. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1213-1217, 2009.

BRESCIANI, K. D. S. Reinoculação de *Toxoplasma gondii* em cadelas gestantes portadoras de infecção toxoplásmica natural. 2003.109f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

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

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

CAMARGO, M. E. Introdução as técnicas de imonofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 143-171, 1973.

CAMARGO, M. E. Improvided 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.

CARNEIRO, A. C. A. V.; CARNEIRO, M.; GOUVEIA, A. M. G.; GUIMARÃES, A. S.; MARQUES, A. P. R.; VILAS-BOAS, L. S.; VITOR, R. W. A. Seroprevalence and risk factor of caprine toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parsitology**, Amsterdam, v. 160, p. 225-229, 2009.

CAVALCANTE, A. C. R.; CARNEIRO, M.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; VITOR, R. W. A. Risk factor for infection by *Toxoplasma gondii* in heards of goats in Ceará, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 36-41, 2008

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

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2ª Edição, Belo Horizonte: CBRA, 49p., 1998.

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

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

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

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

.

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

CHIARI, C. A.; NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 3, p. 337-340, 1984.

COELHO, L.A.; SASA, A.; NADER, C.E.; CELEGUINI, E.C.C. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia***,* v. 58, n. 4, p. 544-549, 2006.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PULSSELY, P. R. Improved microtechinique for the leptospiral microscopic agglutination. **Applied Microbiology**, v.25, n.6, p.976-980. 1973.

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.

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.

DELGADILLO, J.A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. **Small Ruminant Research**, v. 9, p 47- 59, 1992.

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

DOMINGUES, L.M. ; MACHADO, R.Z. ; TINUCCI COSTA, M. ; CARVALHO, C.S. ; COSTA, A.J. ; MALHEIROS, E.B. Canine toxoplasmosis : a comparative evaluation of the detection of anti-Toxoplasma gondii antibodies by the immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reacion (IIF). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.79-85, 1998.

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

DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 5, p. 794-795, 1980.

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

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

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

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

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association***.* v. 189, p.166-170, 1986.

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

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

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1990.

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

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**. v.74, p.75-771998.

DUBEY, J. P., HAMIR, A. N. Experimental toxoplasmosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Journal of Parasitology**, New York, v. 88, n. 3, p. 514-9, 2002.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Human..* CRC Press, Boca Raton, Florida, 2 ed., 220p, 2010

FARIA, E. B.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, M. L. C. R. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.149, p. 126-129, 2007.

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**, Amsterdam, v. 123, p. 161-166, 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.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. ***Sciences*.** v. 167, p. 893-896, 1970.

FUENTS, S. I.; RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C. J.; FERNANDO, C. C.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis

diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, New York, v. 3, n. 10, p. 2368-2372, 1996.

GAMBLE, H.R. Parasites associated with pork and pork products. **Revue Scientifique et Technique**, v. 16, n. 2, p. 496-506, 1997.

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

GONDIM, L. F. P.; BARBOSA, H. V.; RIBEIRO FILHO, C. H. A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 3, v. 82, p. 273-276, 1999.

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

GREYLING, J.P.C.; GROBBELAAR, J.A.N. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rans using different collection techiniques. **South African Journal of Animal Science**. 13, 250-252, 1983

GUESDON, J.L.; TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. The use of avidin-biotin interaction in Immunoenzumatic techniques. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.27, n.08, p. 1131-1139, 1979

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

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

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analysis Biochemistery, Orlando**, v.48, p.422-427, 1972.

HENKEL, R.; MAAB, G.; BÖDEKER, R.; SCHEIBELHUT, C.; STALF, T.; MEHNERT, C.; SCHUPPE, H.; JUNG, A.; SCHILL, W. Sperm function and assisted reproduction technology. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 4, p.7.30, 2005.

HERRMANN, D. C.; PANTCHEV, N.; GLOBOKAR VRHOVEC, M.; BARUTZKI, D.; WILKING, H.; FROHLICH, A.; LUDER, C. G. K.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G.. Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 285-292, 2010.

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

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

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

HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; BARANDIKA, J.; GARCIA-PÉREZ, A.L. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinary Parasitology**. 102. 17-27. 2001.

ISHAG, M. Y.; MAJID, A. M. *Toxoplasma gondii* Infection among a caprine farm workers. **Internacional Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 1, p. 12-14, 2008.

ISHIZUKA, I. Comparative study of the Sabin-Feldman and indirect immunofluorescence tests for the detection of antitoxoplasma antibodies in serum sample from dogs. II. Comparasion with haemagglutination test. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 11, p. 127-132, 133-138, 1974.

IVANA, L.; OLGICA, D.D.; SOFIJA, K.K.; ALEKSANDRA, N. Cross sectional survey of toxoplasma gondii infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. V. 135, p.121-131, 2006.

JACOBS, L. The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs and man. **Public Helth Reports**, New York, v. 72, n. 10, p. 872-82, 1957.

JACOBS, L. New Knowledge of toxoplasma and toxoplasmosis. **Advances in Parasitology**, New York, v. 11, p. 631-65, 1973.

JAMRA, L. M. F.; VIEIRA, M. P. L. Isolamento do *Toxoplasma gondii* de exsudato peritoneal e órgãos de camundongos com infecção experimental**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, p. 435-441, 1991.

JITTAPALAPONGA, S.; SANGVARANONDA, A.; PINYOPANUWATA, N.; CHIMNOIA, W.; KHACHAERAMB, W.; KOIZUMIC, S.; MARUYAMA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, p. 17–22, 2005.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; SANDERS-LEWIS, K.; WILSON M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 405-410, 2007.

KAMANI, J.; MANI, A.U.; EGWU, G.O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep and goats in Borno state, Nigeria. **Tropical Animal Health and Production**. v.42, p793-797, 2010. (pesquisar cidade)

KAMANI, J.; EGWU, G.O.; MANI, A.U.; BITRUS, Y. Survey of *Toxoplasma gondii* DNA in aborted Ovine and Caprine fetus by nested PCR in Borno state, Nigeria. **Veterinary World.** v. 3, n.8, p-360-363, 2010.

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

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

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

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

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

LOPES, W. D. Z.; SANTOS, R. S.; ROSSANESE, W. M.; SANTANA, L. F.; SANTOS, T. R.; COSTA, A. J. Pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1909) em ovinos do município de Jaboticabal, SP (Dados Preliminares). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & 2º SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES, 14., 2006. **Anais...** Ribeirão Preto, 2006, p. 357

LUTF, R. Z.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis. **Journal of Infectious Diseases,** v. 157, p. 01-06, 1988.

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

MAIA, M. S. **Manual de Inseminação Artificial em Caprinos e Ovinos**. Sebrae, Rio Grande do Norte, 1998. p. 49.

MAINARDI, R. S.; MODOLO, J. R.; STACHISSINI, A. V. M.; PADOVANI, C. R.; LANGONI, H. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no

Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, p. 759-761, 2003.

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

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

.

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.

MIYAMOTO, A.; UMEZU, M.; HAMANO, K.; MASAKI, J. Seasonal changes in inhibin activity in seminal plasma and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in the male goat (*Capra hircus*). **Theriogenology,** v. 28, n.1, p.67-76, 1987.

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

MORAES, E.P.B.X.; BATISTA, A.M.; FARIA, E.B.; FREIRE, R.L.; FREITAS, A.C.; SILVA, M. A. R.; BRAGA, V.A.; MOTA,R.A. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated sêmen containing different doses of tachyzoites in sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.170, p.318-322, 2010.

MOURA, A. B. *Toxoplasma gondii*: avaliação da infecção experimental em suínos (*Sus scrofa*) machos, com ênfase no sistema reprodutor. 2004. 104f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária.) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

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.

NETO, J. O.; AZEVEDO, S. S.; GENNARI, S. M.; FUNADA, M. R.; PENA, H. F.; ARAÚJO, A. R.; BATISTA, C. S ; SILVA, M. L.; GOMES, A. A.; PIATTI, R. M.; ALVES, C. J. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 156, p. 329-332, 2008.

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

NUNES, J. F. Inseminação Artificial em Caprinos. In: GONCALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal.** São Paulo: Varela, p. 111-125. 2002.

OKERE, C. ; CHIBOKA, O. ; MONTSMA, G. Effect of frequent ejaculation of West African dwarf goat on semen characteristics. **Animal Reproduction Science**. V.11, 249-258, 1986.

O'ROURKE, K. Zoonotic risk of pest: how to handle questions. **Jounal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 220, n. 10, p. 1439-42, 2002.

PANDEY, R.P.; SINHA, S.N. SINGH, B.; AKHTAR, M.H. Characters of semen and fertility rate in Saanen and Barbari bucks. **Indian Journal of Animal Sciences**. v 55, 773-774, 1985.

PAULA, N. R. O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J. F. S.; SANTOS, D. O.; ELOY, A. M. X. Reprodução no macho caprino: Análise Básica e Aplicada. Embrapa Caprinos e Ovinos. ISSN 1676-7659. **Publicação on line** Sobral, CE, 2008

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, p. 534-543, 2000.

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

RAGOZO, A.M.A.; PENA, H.F.J.; YAI, L.E.O.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of samall ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, p307-312, 2010,

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.

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

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

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

SAAD, R.; VINCENT, J.F.; CIMON, B.; DE GENTILE, L.; FRANCOIS, S. ; BOUACHOUR, G. ; IFRAH, N. Pulmonary toxoplasmosis after allergenic bone marrow transplatation : case report and review. **Bone Marrow Transplant**, v.18, n.01, p.211-212, 1996.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **The Journal of the American Medical Association**, v. 116, n. 9, p. 801-807, 1941.

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

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.

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

SCARPELLI, L. C. Viabilidade da transmissão venérea do *Toxoplasma gondii* em bovinos. 2001. 128f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

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

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

SILVA, J. S.; CASTRO, R. S.; MELO, C. B.; FEIJO, F. M. C. Infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 6, p.726-731, 2005.

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

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

SPENCE, J. B.; BEATTIE, J.; FAULKNER, L.; WATSON, W.A. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. **Veterinary Record**, London, v. 102, n. 2, p. 38-39, 1978.

SREEKUMAR, C.; RAO, J.R.; MISHRA, A.K.; RAY, D.; JOSHI, P.; SINGH, R.K. **Veterinary Record**, London, v. 154, n.20, p.632-635, 2004.

STORMOEN, M.. DAAE, K.M.; HOPP, P.; HOFSHAGEN, M.; THARALDSEN, J. *Toxoplasma gondii* induced abortion storm in a dairy goat herd. **Narsk Veterinaertidsskrift**. V122, n.1, p.7-17, 2010.

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

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**, London, v. 111, p. 53-55, 1982.

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

TODD, E. C. D. Preliminary estimates of costs in food borne disease in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 595-601, 1989.

VIDOTTO, O.; COSTA, A. J. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. Observações clínicas e hematológicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 39, p. 623-639, 1987.

VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; MITSUKA, R.; GIRALDI, J. Avaliação de infectividade de oocistos de *Toxoplasma gondii*, cepa P, estocados em geladeira. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 2., 1986, Londrina. **Anais...** Londrina, 1986. p. 20.

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

ZAMAN, V. Morfology of *Toxoplasma* oocysts and its comparison with other cat coccidian. **South Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 1, n. 3, p. 329-335, 1970.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **Aids**, v. 7, n. 3, p. 299-316, 1993.

YAI, L.E.O.; VIANNA, M.C.B.; SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R.L.; RICHTZENHAIN, L.J.; GENNARI, S.M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by biossay in mice and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 40, 227-234. 2003.

ANEXO

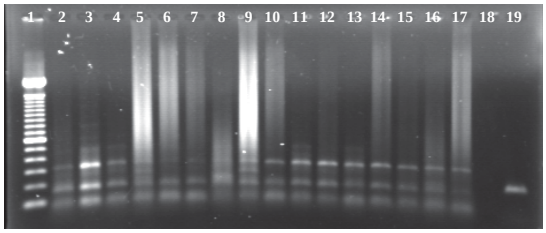


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (100 pb) ; Tecidos da Cabra 1013 (02 – M. Cardíaca; 03–Cérebro; 04–M. Esquelética; 05–Útero; 06–Ovário; 07– Vagina; 08–Fígado; 09–Baço); Tecidos da Cabra 1040 (10–Ùtero; 11– M. Esquelética; 12–Vagina; 13–Cérebro; 14–Ovário; 15–M Cardíaca; 16–Fígado; 17–Baço); 18– controle negativo; 19–controle positivo

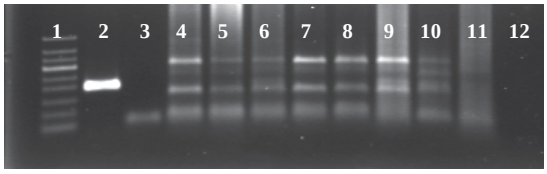


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03– Controle negativo; Tecidos da Cabra 1088 (04–Útero; 05–Ovário, 06–M, Cardíaca; 07–M. Esquelética; 08–Cérebro; 09–Fígado; 10–Vagina; 11–Baço); 12–vazio

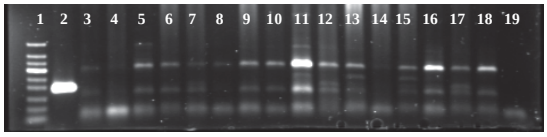


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; Tecidos da Cabra 1003 (03–M Cardíaca; 04–Fígado; 05–M

Esquelética; 06–Útero; 07–Ovário; 08–Cérebro; 09–Baço; 10–Vagina); Tecidos da Cabra 1048 (11–Vagina; 12–Fígado; 13–Ovário; 14–Baço; 15–Útero; 16–Cérebro; 17–M Cardíaca; 18–M Esquelética); 19–controle negativo

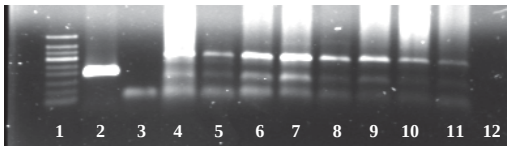


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03–Controle negativo; Tecidos da Cabra 1032 (04–Fígado; 05–M Esquelética; 06–Útero; 07–M Cardíaca; 08–Cérebro; 09–Ovário; 10–Baço; 11–Vagina); 12–vazio

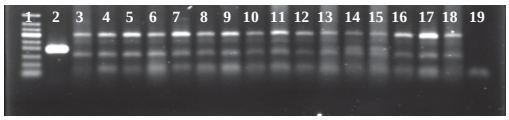


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; Tecidos da Cabra 1077 (03–Útero; 04–M Cardíaca; 05–M Esquelética; 06–Fígado; 07–Cérebro); Tecidos da Cabra 1031 (08–Cérebro; 09–Ovário; 10–M Cardíaca; 11–Útero; 12–Vagina; 13–Fígado; 14–M Esquelética; 15–Baço); Tecidos da Cabra 1055 (16–M Cardíaca; 17–Cérebro; 18– Fígado); 19–controle negativo

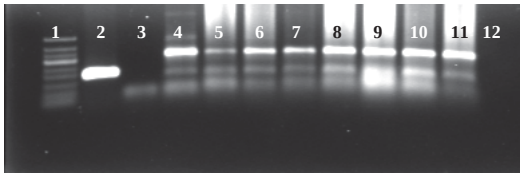


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; 03– Controle negativo; Tecidos da Cabra 1055 (04–M Esquelética; 05–Útero + Placenta; 06– Baço; 07–Vagina); Tecidos do Cabrito da Cabra 1064 (08–M Cardíaca; 09–Fígado; 10–Cérebro; 11–Baço); 12–Vazio

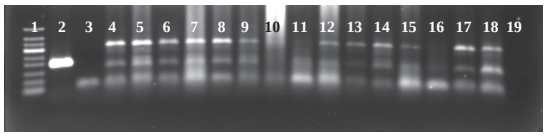


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; 03– controle negativo; Tecidos da Cabra 1064 (04–Cérebro; 05–M Cardíaca; 06–M Esquelética; 07–Fígado; 08–Vagina; 09–Útero; 10–Baço); Tecidos do caprino macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (11–Vesícula Seminal; 12– Testículo; 13–Próstata; 14–Epidídimo) Tecidos do caprino macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* (15–Testículo; 16–Epidídimo; 17–Próstata; 18–Vesícula Seminal); 19–Vazio

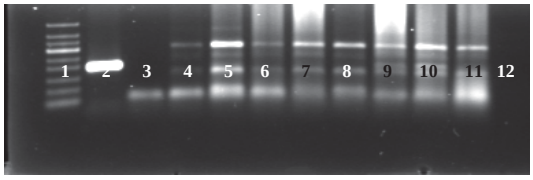


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–

controle positivo; 03–Controle negativo; Tecidos do Cabrito da Cabra 1031 (04–Cérebro; 05–M Cardíaca; 06–Fígado; 07–Baço); Tecido do Cabrito da Cabra 1055 (08–Cérebro; 09–Baço; 10–M Cardíaca; 11–Fígado); 12–vazio

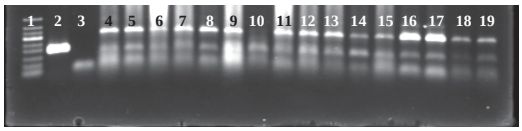


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03– Controle negativo; Tecidos do Cabrito da Cabra 1077 (04–Fígado; 05–M Cardíaca; 06–Baço); Tecidos do aborto da Cabra 1003 (07–M Cardíaca; 08–Cérebro; 09–Fígado; 10–Placenta; 11–Baço); Tecidos do aborto da Cabra 1013 (12–M Cardíaca; 13–Baço; 14–Placenta; 15–Fígado); Amostras Seminais do macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* (16– 7DPI; 17 - 5DPI; 18– 3DPI; 19–1DPI)

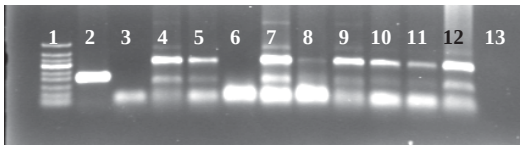


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02–controle positivo; 03– Controle negativo; Amostras seminais pós infecção do macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* (04–21DPI; 05– 14DPI; 06–11DPI; 07–9DPI; 08–7DPI; 09– 49DPI; 10–42DPI; 11–35DPI; 12– 28DPI); 13–vazio

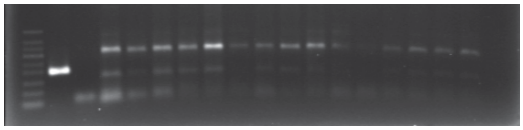


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; 03– controle negativo; Amostras seminais pós infecção do macho inoculado com 2 x 10^5 oocistos de *T. gondii* (04–70DPI; 05– 63DPI; 06– 56DPI); Amostras seminais pós infecção do bode inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (07–21DPI; 08– 14DPI; 09–11DPI; 10–9DPI; 11–7DPI; 12– 5DPI; 13–3DPI; 14–1DPI; 15– 28DPI; 16– 56DPI; 17–49DPI; 18–35DPI; 19 Vazio).

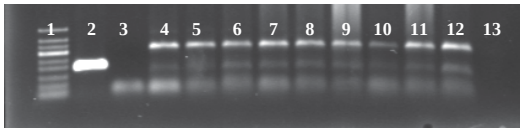


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 2% de materiais genéticos amplificados na PCR. 01 – Marcador de peso molecular DNA Lader (50 pb); 02– controle positivo; 03– Controle negativo; Amostras seminais pós infecção do macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (04–70DPI; 05– 63DPI; 06- 42 DPI); Tecidos do aborto da Cabra 1032 (07–M Cardíaca; 08– Fígado; 09– Cérebro; 10– Baço; 11– Placenta); Amostra seminal pós infecção do bode inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *T. gondii* (12- 7DPI) ;13 – vazio.

Figura 24. Cabra 1012 e os produtos da gestação decorrentes da cobertura por macho não inoculado (Controle)

Figura 25. Aborto aos 100 dias de gestação da Cabra 1032 coberta naturalmente pelo macho inoculado com 1 x 10^6 taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

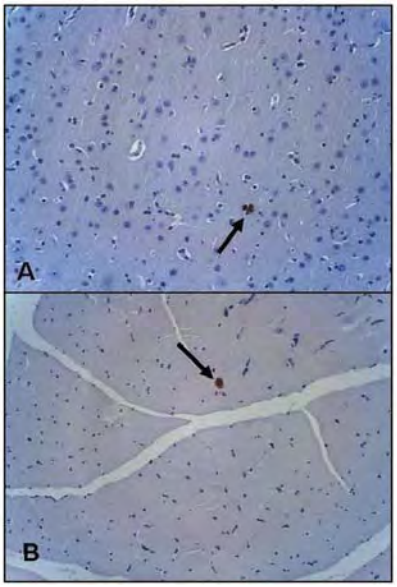


Figura 26. A) Fotomicrografia do cérebro da cabra 1048. Seta mostrando Imunodetecção de *Toxoplasma gondii.* B) Fotomicrografia de musculatura esquelética da cabra 1064. Seta mostrando Imunodetecção de *Toxoplasma gondii* Complexo de polímero ligado a peroxidase (Objetiva de 40x).

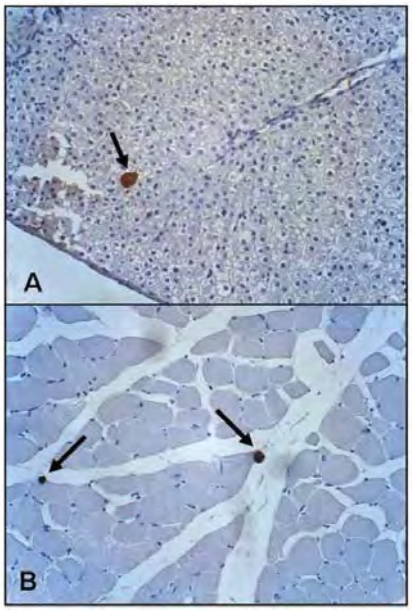


Figura 27. A) Fotomicrografia do fígado da cabra 1003. Seta mostrando Imunodetecção de *Toxoplasma gondii.* B) Fotomicrografia de musculatura esquelética da cabra 1040. Seta mostrando Imunodetecção de *Toxoplasma gondii* Complexo de polímero ligado a peroxidase (Objetiva de 40x).