

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

SÍLVIO GOMES DE SÁ

TRANSMISSÃO VENÉREA DE *Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OOCISTOS DA CEPA ME49

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia F. Pôrto

RECIFE-PE
2011

Ficha Catalográfica

S111t Sá, Sílvio Gomes de
Transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* em
camundongos experimentalmente infectados com oocistos
da cepa ME49 / Sílvio Gomes de Sá. -- 2011.
82 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
Medicina Veterinária, Recife, 2011.

Inclui anexo, apêndice e referências.

1. Veterinária 2. *Toxoplasma gondii* 3. Cepa ME49
4. Toxoplasmose 5. Animais de laboratório 6. Sorologia
7. PCR 8. PCR - Nested I. Mota, Rinaldo Aparecido,
Orientador II. Título

CDD 636.089692

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

TRANSMISSÃO VENÉREA DE *Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OOCISTOS DA CEPA ME49.

Dissertação de Mestrado elaborada por

SÍLVIO GOMES DE SÁ

Aprovada em 23/02/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Universidade Federal Rural de Pernambuco
(Orientador)

Dra. Érica Paes Barreto Xavier de Moraes
Biovotech - Indústria e Comércio de Produtos Biotecnológicos LTDA- ME

Profa. Dra. Maria Aparecida da Glória Faustino
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Rita de Cássia Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Especialmente à toda minha família, nas pessoas de minha mãe Oraíde Tenório Leal, minha irmã Silvânia Gomes de Sá, ao meu pai Urbano Gomes de Sá (*in memoriam*) e ao meu orientador-amigo, o professor Rinaldo Aparecido Mota, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao Mestre dos Mestres, Jesus, O Cristo, por tudo e todos em minha vida. Obrigado mãezinha pelas vigílias e orações, igualmente te agradeço maninha por toda compreensão e apoio.

Agradeço aos meus irmãos, Alexandre, Ulisses e Urbano Júnior, às minhas cunhadas Claudiane, Lílian e Fernanda e ao meu cunhado Sandro Bandeira pelos incentivos e torcida. Agradeço aos meus sobrinhos, Gabriel, Tiago Miguel e Guilherme, que tanto dulcificaram meus dias nos dias que mais precisei de um doce.

Ao Professor Rinaldo Aparecido Mota, meu muito obrigado pelo carinho, abnegação e paciência infindáveis. Nada seria possível sem a sua presença constante, seu compromisso com a causa e sem a importância que você nos dá. Obrigado professor! Muito obrigado!

Muito obrigado Prof. Lêucio Câmara pelos préstimos multiplicados, Profa. Maria Aparecida da Glória pelos cuidados e zelos maternos, Profas. Márcia Brayner e Maria José que desde a graduação me mostraram as mil faces da lisura e bondade. Obrigado Prof. Frederico Maia. Obrigado à dupla Dra. Diana e a técnica Irene do H.V., pelos constantes estímulos e torcida. Gostaria de agradecer especialmente ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi (UNIVASF) pelas grandes contribuições nos diagnósticos moleculares.

Ao professor e amigo Leonildo Galiza pelo carinho e amizade, obrigado.

Ao querido colega Rodolfo Godoy pela parceria e honestidade. Ao médico veterinário Mauro Bezerra, grandessíssima aquisição do coração, muito obrigado por tudo. Obrigado Dra. Érica Paes Barreto, doutora indo e voltando, pessoa fundamental nessa construção. Obrigado futura doutora e ser humano exemplar, Pommy Kim, Deus ilumine teus passos sempre.

Obrigado Dra. Nair Lira pela amizade e orientação.

Muito obrigado Professor Fabrício B. de Sá, pelos estímulos constantes. Obrigado aos professores José Wilton Júnior e sua esposa Andréa Alice, vocês contribuem para o bem estar global. Muito obrigado também a família do laboratório de Bacterioses: Orestes, André, Pedro Paulo, Débora, Rennan, Jefferson, Eugênio, Raíssa (rairunga residente), Vanessa, Eduardo Bento vocês não sabem a importância que têm e como contribuíram para estes modestos resultados.

Às doutorandas que tanto compartilharam comigo seus anseios, esperanças e alegria: Débora Rochelly e Mércia Barros, “obrigadão”. À mestranda Érika Samico, colega de curso, tua bondade é contagiante, muito obrigado. Meu muito obrigado a Profa. Dra. Rita de Cássia Maia pelas elucidações “imunológicas” de última hora. Obrigado a todos os professores das disciplinas do mestrado por toda paciência e atenção, por toda contribuição, meu muito obrigado.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, nas pessoas dos Drs. (as) Gerlane Tavares de S. Chioratto, Giuliana Viegas Schirato, Adolpho M. Antoniol de Moura e do Zootecnista Sr. Jorge Ricardo F. da Silva, pela doação dos animais do experimento e pela atenção e compromisso constantes, meu muito obrigado. Agradeço também ao COMUT, na pessoa de Ana Catarina, um anjo de prestatividade. À Coordenação da pós-graduação, na pessoa de Tom Menezes, muito obrigado.

Muito obrigado ao Prof. Dr. João Luis Garcia e a o doutorando seu orientado, Dalton Zulpo, da Universidade Estadual de Londrina pela concessão dos oocistos da cepa ME49 de *T. gondii*. Obrigado Dona Guiomar pelos cafés e momentos de descontração. Ao Cnpq, pela concessão da bolsa de estudos. Agradeço, e quem sabe não deveria também, dedicar este trabalho aos camundongos, nunca os esquecerei. À dona Fernanda, que tanto me ajudou na preparação das lâminas de histopatologia.

E aos que não gravei o nome aqui, peço perdão e agradeço por tudo, mil folhas não dariam para tanta gratidão.

RESUMO: Objetivou-se com este trabalho estudar a transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* em camundongos experimentalmente infectados com oocistos da cepa ME49. No primeiro experimento estudou-se a presença e distribuição de *T. gondii* no aparelho reprodutor de camundongos machos experimentalmente infectados na fase aguda da infecção. Foram formados cinco grupos experimentais (GM1, GM2, GM3, GM4 e GC - controle), inoculados com 50, 100, 500 e 1000 oocistos, respectivamente. A comprovação da infecção foi feita por meio da pesquisa de anticorpos e presença de DNA parasitário em sangue, urina e tecidos reprodutivos. Tecidos reprodutivos foram histologicamente avaliados para a pesquisa de lesões sugestivas da infecção. Formas sugestivas de *T. gondii* foram observadas na urina aos 7° e 15° dias pós-infecção. Na sorologia apenas um animal do GM2 e todos do GM3 e GM4 apresentaram anticorpos IgM e IgG. Na PCR-Nested, 80% dos animais do GM1 e GM2 foram positivos para pesquisa de DNA no sangue e nenhum animal do GM3 e GM4 foi positivo. Nenhum animal do grupo controle foi positivo na sorologia e técnicas moleculares. Dos machos dos grupos infectados, 30% apresentaram DNA parasitário na próstata, 40% no testículo e epidídimo e 60% na vesícula seminal. Na histopatologia observou-se degeneração testicular, infiltrado mononuclear focal e oligospermia mais acentuada nos animais do GM3 e GM4 e não observadas no GC. O segundo experimento foi realizado com o objetivo principal de estudar a transmissão venérea de *T. gondii* e os distúrbios reprodutivos em camundongas divididas em quatro grupos e acasaladas com machos experimentalmente infectados entre o 2° e 14° dias pós-infecção. A infecção foi comprovada por meio da sorologia e técnicas moleculares. Histopatologia foi realizada em tecidos reprodutivos de machos (próstata, vesícula seminal, testículos e epidídimos) e fêmeas (útero e ovários). Cem por cento dos machos apresentaram DNA parasitário em tecidos do aparelho reprodutor ou no sangue, mas apenas um macho inoculado com 100 oocistos e dez inoculados com 500 e 1000 oocistos soroconverteram, respectivamente. Transtornos reprodutivos também foram observados nas fêmeas acasaladas, contudo essas não apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* e 75% delas (23/40) foram positivas na PCR-Nested. Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que a transmissão venérea do parasita ocorre em camundongos experimentalmente infectados com a cepa ME49 nas doses utilizadas.

Palavras chaves: Toxoplasmose, transmissão venérea, camundongos

SUMMARY: The objective of this study was to verify the venereal transmission of *Toxoplasma gondii* in mice experimentally infected with oocysts of the ME49 strain. The first experiment studied the presence and distribution of *T. gondii* in the reproduction organs of experimentally infected male mice, in the acute infection phase. Five experimental groups were formed (MG1, MG2, MG3, MG4 and CG-control), inoculated with 50, 100, 500 and 1000 oocysts, respectively. The proof of infection was carried out by an antibodies study and the presence of parasitic DNA in the blood, urine and reproductive tissues. Reproductive tissues were histologically evaluated for the study of suggestive lesions from the infection. Suggestive forms of *T. gondii* were observed in the urine at the 7th and 15th post-infection days. In the serology only one animal from the MG2 and all from MG3 and MG4 presented antibodies IgM and IgG. In the PCR-Nested, 80% of animals from MG1 and MG2 were positive in the DNA blood study and no animals from MG3 and MG4 were positive. None of the animals from the control group were positive in serology and molecular techniques. Of the males from the infected groups, 30% presented parasitic DNA in the prostate, 40% in the testicle and epididymis and 60% in the seminal vesicle. In the histopathology, testicular degeneration, focal mononuclear infiltration and more accentuated oligospermia were observed in the animals from MG3 and MG4, but not in the CG. The second experiment was carried out with the objective of studying the venereal transmission of *T. gondii* and the reproductive disturbances in female mice divided in four groups and mated with experimentally infected males between the 2nd and 14th post-infection days. The infection was proven by using the serology and molecular techniques. Histopathology was carried out in reproductive tissues of males (prostate, seminal vesicle, testicles and epididymis) and females (uterus and ovaries). One hundred percent of males presented parasitic DNA in tissues of the reproductive organ or in the blood. However, only one male inoculated with 100 oocysts and 10 inoculated with 500 and 1000 oocysts soroconverted, respectively. Reproductive problems were also observed in mated females, however, they did not present antibodies anti-*T. gondii* and 75% of them (23/40) were positive in the PCR-Nested. The results obtained in this study conclude that the venereal transmission of the parasite occurs in mice experimentally infected with the ME49 strain in the doses used.

Key words: Toxoplasmosis; venereal transmission; mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1: Fases infectantes de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	20

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela. 1: Resultado da PCR e PCR-Nested para pesquisa de *T. gondii* em tecidos reprodutivos de camundongos infectados com a cepa ME49. 47

Tabela 2: Resultado da PCR e PCR-nested de urina em três momentos. 48

Artigo 2

Tabela 1: Frequencias de fêmeas positivas na sorologia, PCR e PCR-Nested de tecidos reprodutivos (útero e ovários) e ocorrência de partos e natimortos. 70

Tabela 2: PCR e PCR-nested de pool de tecidos (cérebro e vísceras) em amostras de natimortos ou neonatos. 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C :Grau Celsius

®:Marca registrada

μL :Microlitro

μM : Micromolar

' :Minutos

% :Porcentagem

'' :Segundos

CEUA:Comitê de Ética no Uso de Animais

CNPq:Conselho Nacional de Pesquisa

Comut:Comutação Bibliográfica

DNA:Ácido Desoxiribonucléico

dNTP:Desoxirribonucleotídeos fosfatados

et al.:Autores colaboradores (Original do latin: “e os outros”)

IgG:Imunoglobulina classe G

IgM:Imunoglobulina classe M

F1:progênie do primeiro parto

P: prole

K :Coeficiente Kappa

mg:Miligrama

μg:micrograma

MHz: Megahertz

Min: Minutos

ml :Mililitro

mM :Micromolar

n :Número de amostra

KB:Kilobyte

Kg:Kilogramas

pb:Pares de bases

PCR:Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: Polimerase Chain Reaction)

p.i.:Pós-infecção

d.p.i.:dias pós- infecção

RIFI:Reação de Imunofluorescência Indireta

IFI:Imunofluorescência Indireta

SF:Reação de Sabin e Feldman

T. gondii :*Toxoplasma gondii*

UFRPE:Universidade Federal Rural de Pernambuco

UI:Unidade internacional

UNIVASF:Universidade Federal do Vale do São Francisco

UV:Ultra-violeta

GM1:grupo de machos um, inoculados com 50 oocistos

GM2:grupo de machos dois, inoculados com 100 oocistos

GM3:grupo de machos três, inoculados com 500 oocistos

GM4:grupo de machos quatro, inoculados com 1000 oocistos

GC:grupo de machos controle, inoculados com 0,5 ml sol.fisiológica

GF1:grupo de fêmeas acasaladas com GM1

GF2:grupo de fêmeas acasaladas com GM2

GF3:grupo de fêmeas acasaladas com GM3

GF4:grupo de fêmeas acasaladas com GM4

GFC:grupo de fêmeas acasaladas com GMC

ANEXO

Artigo 2

Figura 1: Pneumonia intersticial mononuclear difusa HE, 40X.	80
Figura 2: Detalhe do infiltrado mononuclear em pulmão HE, 100X	80
Figura 3: Encéfalo. Foco de infiltrado mononuclear em córtex cerebral. HE, 40 X.	80
Figura 4: Detalhe do infiltrado HE, 100 X.	80
Figura 5: Endométrio. Metaplasia do epitélio com presença de infiltrado constituído predominantemente por polimorfonucleares. HE, 40X.	80
Fig. 6: Endométrio. Detalhe da imagem anterior. Notar a presença de polimorfonucleares no epitélio endometrial.	80
Fig. 7: Foco de necrose em miométrio. HE, 40X.	81
Fig. 8: Miométrio. Presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear. HE, 40 X.	81
Fig. 9: Infiltrado inflamatório constituído por polimorfonucleares com predominância de neutrófilos. HE, 100 X.	81
Figura 10: Útero gravídico com áreas de congestão.	82
Figuras 11 e 12: Fetos sem uniformidade de tamanhos.	82

SUMÁRIO

	Pág.
Introdução	15
OBJETIVOS	16
Geral	16
Específicos	16
REVISÃO DE LITERATURA	17
Toxoplasmose	17
ARTIGO 1- Distribuição de <i>Toxoplasma gondii</i> em tecidos do sistema reprodutor masculino de camundongos inoculados com oocistos da cepa ME49.	31
ARTIGO 2 - Transmissão venérea de <i>Toxoplasma gondii</i> em fêmeas de camundongos Swiss Webster acasaladas com machos inoculados com oocistos da cepa ME49.	49
ANEXO	80

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), que é um protozoário intracelular obrigatório. A doença encontra-se difundida entre seres humanos e animais de sangue quente (TENTER, 2000; TENTER, 2009).

As três principais vias de transmissão são: transplacentária, ingestão de tecidos infectados por cistos (carnes e vísceras) e ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos eliminados nas fezes de felídeos infectados (DUBEY, 1998). A transmissão também pode ocorrer por meio dos taquizoítos presentes no sangue, em transplantes de tecidos ou através de produtos lácteos não pasteurizados, ainda que esta forma infectante seja considerada de pouca importância epidemiológica na transmissão horizontal do agente. Após a parasitemia, o protozoário pode se multiplicar em diversos tipos de tecidos, determinando várias manifestações clínicas (TENTER, 2000; TENTER, 2001).

Nas últimas décadas, alguns autores têm considerado a possibilidade de transmissão venérea desse parasito, pois este já foi isolado em amostras de órgãos reprodutivos e sêmen de várias espécies (SPENCE et al., 1978; DUBEY e SHARMA, 1980; BLEWETT et al., 1982; TEALE et al., 1982; LIU et al., 2006ab; MOURA et al., 2007; SCARPELLI et al., 2009, MORAES et al., 2010c).

Recentemente, LIU et al. (2006b), ARANTES et al. (2009), MORAES et al. (2010a) e MORAES et al. (2010b) relataram distúrbios reprodutivos em fêmeas das espécies leporina, canina e ovina, respectivamente, inseminadas com sêmen contaminado por este parasito. Patologias reprodutivas como retorno ao cio, mucometra, piometra, reabsorção embrionária e abortamentos foram os achados frequentes nas diferentes espécies estudadas. Apesar do registro desses achados clínicos na infecção experimental por *T. gondii*, a transmissão venérea em decorrência da monta natural necessita de estudos.

Dessa forma, estudos que minimizem as questões quanto a esta via de transmissão podem ser de grande importância na epidemiologia da toxoplasmose.

OBJETIVOS

GERAL

Contribuir para o estudo da transmissão horizontal de *T. gondii* via sêmen em camundongos Swiss Webster experimentalmente infectados com oocistos da cepa ME49.

ESPECÍFICOS

Comprovar a transmissão venérea de *T. gondii* de machos experimentalmente infectados para fêmeas na fase aguda da infecção por meio da detecção do DNA parasitário em tecidos reprodutivos das fêmeas (útero e ovário);

Estudar a resposta imune humoral em camundongos machos inoculados via oral com distintas doses de oocistos da cepa ME49;

Verificar a presença de DNA parasitário em tecidos reprodutivos e urina de camundongos machos;

Estudar a resposta imune humoral das fêmeas acasaladas com os machos experimentalmente infectados;

Relatar a ocorrência de patologias reprodutivas nas fêmeas acasaladas com machos experimentalmente infectados;

Verificar a transmissão congênita de *T. gondii* para a progênie por meio da pesquisa do DNA parasitário e anticorpos.

REVISÃO DE LITERATURA

Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença difundida entre os animais de sangue quente sendo causada por um protozoário intracelular obrigatório denominado *Toxoplasma gondii*. É considerada uma das parasitoses mais frequentes no homem e animais. Esse protozoário pertence ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma*, espécie tipo *Toxoplasma gondii* (FRENKEL, 1990; DUBEY, 1994).

De acordo com a Fundação Nacional de Saúde (2000) esta parasitose está classificada como uma zoonose cosmopolita ou doença universal por suas características epidemiológicas. De acordo com dados do Ministério da Saúde (2004), estima-se que 70% a 95% da população humana esteja infectada. Dados recentes mostram que a enfermidade acomete cerca de um terço da população mundial, com prevalência que varia de acordo com as condições geográficas e os hábitos culturais de cada comunidade (FIOCRUZ, 2009).

Nos EUA aproximadamente um sexto da população apresenta sorologia positiva para esse parasito. A infecção por *T. gondii* é geralmente assintomática, mas pode ser severa em indivíduos imunologicamente comprometidos. A infecção foi relatada em todos os continentes, incluindo a Antártida. Em geral, a soroprevalência é mais elevada na América Latina do que na América do Norte e Leste da Ásia e a magnitude dos títulos de anticorpos em alguns dos países ao sul da América Latina é maior do que nos Estados Unidos, talvez devido à maior probabilidade de re-infecções (DUBEY, 1988).

Os agravantes da doença tornam-se ainda mais evidentes na Saúde Pública tendo em vista que em alguns países a exemplo dos Estados Unidos, das 750 mortes atribuídas à toxoplasmose a cada ano, 375 (50%) é causada pela ingestão de carne infectada, tornando a doença a terceira principal causa de mortes de origem alimentar no país (LOPES et al., 2000).

Sabe-se que a sintomatologia e as lesões da toxoplasmose podem ser confundidas com outras doenças, dessa forma, o diagnóstico laboratorial é de grande importância (INNES, 1997).

Para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose, a pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG é a forma mais usada para verificar a ocorrência de infecção e muitas são as técnicas que podem verificar a soroconversão tais como: Sabin-Feldman (dye test); a Imunofluorescência

Indireta (IFI), Aglutinação em Látex (AL), Hemaglutinação (HA), Aglutinação Direta (MAD), Fixação do Complemento (FC), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) entre outras (DUBEY et al., 1987; DUBEY et al., 1988). Nas últimas décadas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido empregada com sucesso no diagnóstico, tendo em vista ser é uma técnica muito sensível, sendo capaz de detectar em amostras clínicas o DNA de único parasita, podendo ser realizado em menos de 24 horas (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005; SPALDING et al., 2006).

T. gondii é um dos coccídios mais estudados no mundo (TENTER et al., 2009), sendo amplamente utilizado como modelo para a biologia celular de organismos apicomplexos (DUBEY, 1988). Até 1970, os bradizoítos e taquizoítos eram os únicos estágios do parasito conhecidos. Estas duas etapas constituem o ciclo de vida assexuada do parasito presente em todos os hospedeiros intermediários de sangue quente, incluindo os aquáticos, terrestres, aves e humanos. Em meados da década de 1960, Willian investigou a transmissão do *T. gondii* pelas fezes de gatos; esse estudo favoreceu a descoberta do oocisto por outros grupos de pesquisadores, culminando com a elucidação do ciclo de vida sexuado do parasito (DUBEY, 2009).

O ciclo de vida de *T. gondii* (Fig.1) constitui-se de duas fases: sexuada (enteroepitelial) e assexuada (extraintestinal). A fase enteroepitelial se desenvolve exclusivamente no epitélio intestinal dos felídeos (hospedeiros definitivos) e inicia-se após a ingestão de oocistos esporulados no ambiente ou cistos contendo bradizoítos presentes na musculatura do hospedeiro intermediário, sendo esta última a forma de infecção mais importante para os felídeos (DUBEY e FRENKEL, 1972).

No intestino dos gatos, os bradizoítos liberados dos cistos teciduais após digestão enzimática, iniciam o ciclo enteroepitelial por meio de multiplicação assexuada (esquizogonia) e o ciclo sexuado dá origem aos gamontes (gametogonia). No ciclo sexuado, após fertilização do gamonte fêmea pelo macho, uma parede se desenvolve em torno do gamonte fêmea fertilizado, formando o oocisto. Os felídeos excretam oocistos nas fezes que esporulam no ambiente transformando-se em esporozoítos infectantes através de divisão meiótica, podendo permanecer infectantes para homens e animais por longos períodos.

A eliminação de oocistos nas fezes dos felídeos ocorre após a ingestão de qualquer um dos três estágios infecciosos de *T. gondii*, ou seja, oocistos, bradizoítos ou taquizoítos (Figura

2). Essas formas, invariavelmente desenvolvem um ciclo de multiplicação sexuada enteroepitelial. Os felídeos são importantes na disseminação da infecção para humanos e outros animais porque são os únicos hospedeiros que excretam oocistos no ambiente (DUBEY, 1994; DUBEY, 1988)

Após a ingestão de alimentos e/ou água contaminados por oocistos, estes se rompem no intestino e liberam oito esporozoítos. Esses se multiplicam nas células intestinais e linfonodos adjacentes dando origem às formas de multiplicação rápida (taquizoítos) que se disseminam por todos os tecidos do hospedeiro por meio do sangue e linfa, eventualmente se encistando no cérebro, musculatura esquelética e cardíaca (DUBEY, 1994).

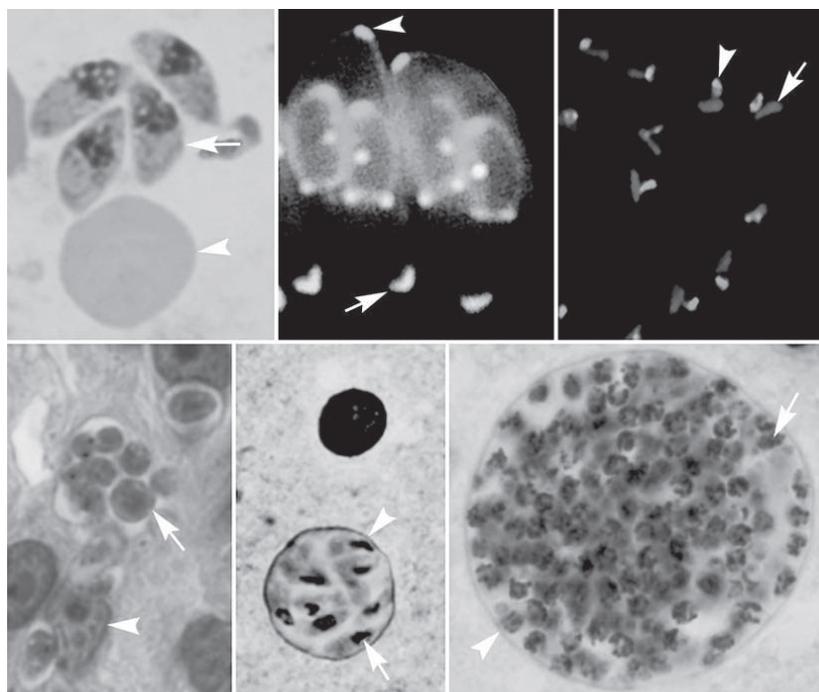


Figura 1: Fotos superiores e 1ª foto debaixo a esquerda: taquizoítos individuais e em divisão intracelular; fotos de baixo ao centro e a direita: cistos em diferentes estágios de formação (adaptado de DUBEY, 2010).

No hospedeiro intermediário, a fase assexuada apresenta duas etapas: na primeira, os taquizoítos se multiplicam rapidamente por endodiogenia em muitos tipos celulares e a última geração dessa multiplicação dá início à segunda fase onde ocorre o desenvolvimento de cistos teciduais contendo bradizoítos que são as formas de multiplicação lenta (TENTER, 2000).

De acordo com Dubey et al. (1988), *T. gondii* apresenta três formas ou estágios infectantes: a): taquizoítos, encontrados individualmente ou em grupos, b): bradizoítos,

encontrados nos cistos teciduais e c): esporozoítos encontrados nos oocistos no ambiente e que podem ser transmitidos por meio de três vias básicas de infecção: a transplacentária, o carnivorismo e a fecal-oral, respectivamente.

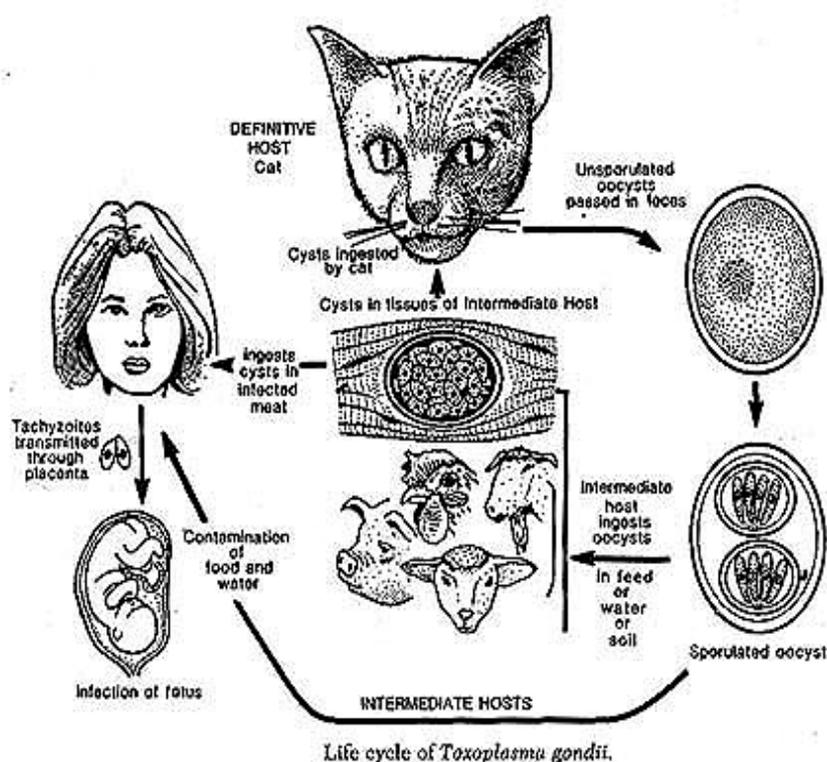


Figura 2 – Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (DUBEY, 1998)

A prevalência da infecção por *T. gondii* em gatos varia de acordo com o estilo de vida. Geralmente é maior nos gatos selvagens que predam do que em gatos domésticos, podendo variar entre os países, em diferentes áreas de um país e dentro da mesma cidade (DEFEO et al., 2002).

O período pré-patente que antecede a eliminação de oocistos nas fezes dos felídeos, bem como a frequência dessa eliminação varia de acordo com o estágio do *T. gondii* ingerido. Em média, a eliminação de oocistos nas fezes ocorre no período de 3 a 10 dias quando da ingestão de cistos teciduais e até 18 dias ou mais após a ingestão oocistos (DUBEY, 2001; DUBEY, 2005).

T. gondii é transmitido por carnivorismo a gatos e a transmissão por oocistos é mais eficiente em hospedeiros não felídeos. Dessa forma, experimentalmente, os bradizoítos são mais infectantes para gatos e oocistos são mais infectantes para camundongos (DUBEY, 1996a; DUBEY, 1996b).

Dubey (1994) assegura que além da ingestão de oocistos no ambiente, a prática do carnivorismo é uma importante via de infecção por meio da ingestão dos cistos contidos nos tecidos. O ciclo induzido pela ingestão de bradizoítos nos hospedeiros intermediários é semelhante ao induzido pela ingestão de oocistos; no entanto os hospedeiros intermediários parecem ser mais suscetíveis à ingestão dessa forma infectante.

Os bradizoítos contidos nos cistos teciduais são uma parte essencial na fase final do ciclo de vida de *T. gondii*, podendo ser ingeridos por animais (carnivorismo), incluindo seres humanos. Cistos teciduais viáveis foram encontrados em tecidos de animais infectados naturalmente, especialmente em suínos, ovelhas e animais de vida livre (DUBEY, 1988).

O taquizoíto é a forma infectante mais delicada do ciclo. É incapaz de sobreviver fora do hospedeiro, sendo destruído pelas secreções gástricas quando ingerido. No entanto pode infectar o feto por via transplacentária, por transfusão de leucócitos infectados e acidentes de laboratório (DUBEY, 1988; TENTER et al., 2009). A via transplacentária ou congênita de transmissão é de grande importância tendo em vista que o parasito é uma das principais causas de aborto nas espécies ovina e caprina em muitos países (DUBEY, 1988).

Os taquizoítos atingem todos os tecidos do hospedeiro (WONG e REMINGTON, 1993), podendo ser detectados em fluídos orgânicos incluindo muco e lágrimas (TENTER et al., 2000), saliva (TERRAGNA et al., 1984; CHIARI e NEVES, 1984; VITOR, PINTO e CHIARI, 1991), urina (ROCHA, TAFURI e CHIARI, 1993; FOROGHI PARVAR e SHOJAEE, 2008) e leite (CHIARI e NEVES, 1984; SKINNER et al., 1990; VITOR, PINTO e CHIARI, 1991; POWELL, BREWER e LAPINN, 2001; COSTA e LANGONI, 2010) de diversas espécies animais.

Embora o taquizoíto também tenha sido detectado no sêmen de caprinos por Dubey e Sharma (1980), os autores afirmaram não existir praticamente nenhum risco de transmissão venérea nessa espécie. Por outro lado, observações posteriores verificaram a presença do agente no sêmen e tecidos do aparelho reprodutor em machos das espécies ovina (SPENCE et al., 1978; BLEWETT et al., 1982; TEALE et al., 1982; LOPES et al., 2007; MORAES et al.,

2008c; MORAES et al., 2010d), suína (MOURA et al., 2006), leporina (Liu et al., 2006b), bovina (SCARPELLI et al., 2009) e canina (ARANTES et al., 2009), discutindo-se a possibilidade da transmissão venérea desse parasito.

A infectividade de *T. gondii* excretado no sêmen de várias espécies a exemplo de ovinos (LOPES et al., 2007) e caprinos (SANTANA et al., 2010) foi verificada por meio da bioprova. Na espécie bovina, Scarpelli et al. (2009), utilizando duas formas e vias distintas de infecção verificaram a presença do parasito no sêmen sinalizando para a possibilidade de transmissão venérea do agente. Liu et al. (2006a) verificaram que o sêmen de coelhos contaminados com taquizoítos por via intraperitoneal foi capaz de causar toxoplasmose em coelhas após inseminação com esse sêmen.

Moraes et al. (2010a) e Moraes et al. (2010b) verificaram soroconversão e patologias reprodutivas como reabsorção embrionária, partos distócicos, natimortalidade, hidrometra, mucometra e apresentação de cistos foliculares em ovelhas após inseminação translaparoscópica com distintas doses de sêmen contaminado com taquizoítos do parasito.

Arantes et al. (2009) constataram que o sêmen contaminado com taquizoítos no momento da inseminação, transmite o parasito para cadelas quando da sua deposição intravaginal, ocasionando distúrbios reprodutivos como reabsorções embrionárias, abortamentos e natimortalidade, concluindo que a transmissão de forma venérea pode ocorrer.

Liu et al. (2006b), em experimento com a espécie leporina, observaram que o longo período de excreção do agente no sêmen (até 88 dias), sua grande concentração no ejaculado e a soroconversão de coelhas inseminadas artificialmente com esse sêmen merecem séria reflexão, embora não se saiba se *T. gondii* presente no sêmen pode ser infeccioso durante o coito.

Um outro coccídio intracelular pertencente à mesma sub-família de *T. gondii*, *Neospora caninum*, muito se assemelhando no que se refere à patogenia e ciclo biológico (Dubey e Lindsay, 2006), vem sendo estudado quanto à possibilidade de ser transmitido através do coito, principalmente na espécie bovina, pois taquizoítos desse parasito também foram isolados no sêmen de touros (ORTEGA-MORA et al., 2003; SERRANO-MATÍNEZ et al., 2006) e a hipótese da transmissão venérea do agente tem sido cogitada.

Por outro lado, Osoro et al. (2009) consideraram que esta via de transmissão horizontal não ocorre, tendo em vista os resultados obtidos em seu experimento, o mesmo constou do acasalamento entre touros e novilhas, os touros foram desafiados com uma primeira dose de

taquizoítos (10^8 i.v.) e re-infectados treze meses depois com a mesma dose. No entanto, a via de infecção não foi a natural para a espécie modelo e os acasalamentos se deram numa fase em que os machos já haviam desenvolvido defesa imunológica.

Na literatura, estudos que confirmam a transmissão de *T. gondii* na ocasião do acasalamento, (considerando que os momentos da infecção e da concepção são os mesmos) são escassos ou inexistentes. Berverley (1959) sugeriu que a infecção parecia não ser transmitida através de gotículas, fezes, urina e cópula. No entanto nesse estudo foi utilizada uma via improvável de ocorrer na infecção natural (injeção de cistos teciduais por via subcutânea); as fêmeas eram os animais inoculados e o objetivo consistiu em verificar a transmissão congênita por várias gerações.

Em meados de 1950, foram publicados vários resultados de experimentos onde se verificou distúrbios reprodutivos e ocorrência de transmissão transplacentária em camundongas gestantes infectadas a partir da deposição intravaginal de uma suspensão obtida de cérebros de camundongos com toxoplasmose (COWEN e WOLF, 1950a; COWEN e WOLF, 1950b; COWEN e WOLF, 1950c).

Segundo Fialho (2009), os desenhos experimentais no estudo da toxoplasmose congênita em geral, consistem na imunização das futuras mães antes da concepção, no desafio durante a gestação e a detecção ou não de anticorpos nos recém nascidos. Modelos experimentais utilizando roedores têm sido amplamente utilizados no estudo da toxoplasmose, especialmente no estudo dos distúrbios reprodutivos causados pelo *T. gondii*.

Dubey e Frenkel (1998) afirmaram que a evolução clínica e a transmissão transplacentária da toxoplasmose em ratos e seres humanos é semelhante e que o estudo da infecção usando ratos como modelo pode servir para o avanço no conhecimento da toxoplasmose humana. Camundongos também têm sido utilizados com sucesso no estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na transmissão congênita da toxoplasmose (MENZIES F.M; HENRIQUEZ F.L; ROBERTS C.W., 2008).

Berverley (1959) foi um dos pioneiros na pesquisa utilizando o modelo murino no estudo da toxoplasmose congênita e afirmaram que a transmissão através desta via pode ocorrer em gerações sucessivas.

Dubey e Frenkel (1998), em estudo sobre as relações do parasito com o hospedeiro asseguraram que a infecção e a doença clínica podem variar na dependência da cepa, do estágio do parasito, da dose infectante e da via de inoculação utilizada.

Filho et al. (2001) comprovaram que coelhas gestantes são muito sensíveis a oocistos de *T. gondii* e apresentaram severas alterações em diversos órgãos, assim como aborto e óbito prematuro. Por outro lado, ratas e camundongas infectadas com oocistos e doses semelhantes da cepa VEG reagiram de maneira distinta, ratas foram mais resistentes que camundongas e o surgimento de cistos cerebrais foi similar para ambas as espécies (DUBEY e FRENKEL, 1998).

Innes (1997) afirmaram que o camundongo tem sido largamente utilizado no estudo da toxoplasmose congênita onde em geral as fêmeas são desafiadas durante algum período da gestação. No entanto, refere-se à dificuldade de comparar resultados das diferentes pesquisas tendo em vista a diversidade de cepas e formas infectantes do parasito e de linhagens de camundongos.

Referências

ARANTES, T. P. et al. ***Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by sêmen in dogs.** Experimental. Parasitology. 123(2):190-4 2009.

BEVERLEY, J.K.A. **Congenital transmission of toxoplasmosis through sucessive generations of mice.** Nature, Sheffield, Inglaterra, v. 183, p.1348, 1959.

BLEWETT, D. A. et al. **Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission.** The Veterinary Record, London, v. 24, n.111, p.73-75, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.** 3. ed. – Brasília: DF. v.: II il. color. 200p. 2004.

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

COWEN, D; WOLF A. **Experimental congenital toxoplasmosis I. The vagina as a portal of entry of toxoplasma in the mouse,** The Journal of Experimental Medicine, Nova York, 92: 393–402, 31 October 1950a.

_____. **Experimental congenital toxoplasmosis: II. Transmission of toxoplasmosis to the placenta and fetus following vaginal infection in the pregnant mouse.** The Journal of Experimental Medicine, Nova York, 92, 403–416. Oct 31, 1950b.

_____. **Experimental congenital toxoplasmosis. III. Toxoplasmosis in the offspring of mice infected by the vaginal route. Incidence and manifestations of the disease.** The Journal of Experimental Medicine, Nova York, 92:417–429, Nov 1950c.

DEFEO, M.L. et al. **Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents.** American Journal of Veterinary Research, v. 63:1714-1717. Dez. 2002.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis.** Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, v. 205, n.11, p. 1593-1598, 1994.

_____. **Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats.** The Journal of Protozoology, v.82, 951–956, 1996b.

_____. **Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats.** The Journal of Protozoology, Beltsville, Maryland. 82, 957–961, 1996a.

_____. **Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts.** Veterinary Parasitology. v.140 p. 69–75. 2006.

_____. **History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*.** International Journal for Parasitology , Oxford, v. 39, p. 877–882, 2009.

_____. **History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*.** International Journal for Parasitology, Beltsville, MD, 39, 877–882, 2009.

_____. **Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice.** Journal of Parasitology, Maryland, v. 87, 215–219, 2001.

_____. **Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats.** The Journal of Parasitology, Maryland, v. 88, n. 4, 2002.

_____. **Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation.** Veterinary Parasitology, Beltsville, MD, 133, 289–298, 2005.

DUBEY J. P., LINDSAY D. S., SPEER C. A. **Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts.** Clinical Microbiology Reviews, n. 2, p. 267-299. 1998.

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

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

DUBEY, J. P. et al. **Serodiagnosis of perinatally and prenatally induced toxoplasmosis in sheep.** American Journal of Veterinary Research, Chicago, v. 48, p. 1239-1243, 1987

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. **Cyst induced toxoplasmosis in cats.** The Journal of Protozoology, Lawrence, v. 19, p. 155-177, 1972.

ENGRACIA J.R. et al. **Toxoplasmose experimental em coelhas gestantes.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.22, n.1, p.3-10 jan./jun. 2001.

FIALHO, C.G. **Modelo hamster (Mesocricetus auratus waterhouse, 1839) para estudo da toxoplasmose congênita.** Porto Alegre, RS. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2009.

FIOCRUZ. **Pesquisadoras trabalham em vacina de DNA contra a toxoplasmose - Pub. em:** 09/01/2006. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1543&query=simple&search%5Fby%5Fauthorname=all&search%5Fby%5Ffield=tax&search%5Fby%5Fheadline=false&search%5Fby%5Fkeywords=any&search%5Fby%5Fpriority=all&search%5Fby%5Fsection=all&search%5Fby%5Fstate=all&search%5Ftext%5Foptions=all&sid=116&text=TOXOPLASMA>. Acesso: 20/10/2009.

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

FUX B. et al. **Experimental toxoplasmosis in BALB/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, 121-126, 2000.

INNES E.A. **Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response.** Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. Edinburgh, v. 20, 131-138, 1997.

KOMPALIC-CRISTO, A. et al. **Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 229-235, 2005.

LIU, S. G. et al. **Brief report: Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits infected with *Toxoplasma* tachyzoites.** Chinese Medical Journal, Wuhan, v. 20;119(8):701-4.. 2006a.

LIU, S.G. et al. (b); **Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits.** Zhongguo Ji; Sheng Chong Xue; Yu Ji Sheng; Chong Bing; Za Zhi. Xinxiang, v. 24,166-70. 2006b.

LOPES, P. et al. **Preventing Congenital Toxoplasmosis.** MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control, Atlanta, v. 31, 59-68, 2000.

LOPES, W. D. Z. **Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (*Ovis aries*) machos experimentalmente infectados.** Jaboticabal. **Dissertação de Mestrado – FCAVJ – Universidade Estadual Paulista**, p. 75, 2007.

MENZIES, FM; HENRIQUEZ FL; ROBERTS CW. **Immunological control of congenital toxoplasmosis in the murine model.** Immunology Letters, Paisley, Jan 29, 115(2):83-9. 2008.

MORAES, E. P. B. X. et al. **Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados.** Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 30, 915-917, 2010d.

MORAES, E. P. B. X. et al. **Reproductive failure in the initial phase of gestation in sheeps experimentally inoculated via semen with *Toxoplasma gondii*.** In: Toxoplasma Centennial Congress, 2008, Búzios. TCC - Toxoplasma Centennial Congress. Rio de Janeiro : UENF, 2008b.

MORAES, E. P. B. X. et al. ***Toxoplasma gondii* infection via semen in sheeps.** In: Toxoplasma Centennial congress, 2008, Búzios. TCC - From discovery to Public Health Management. Rio de Janeiro : UENF, p. 113.2008a.

MORAES, E.P.B.X. et al. **Experimental infection by *Toxoplasma gondii*, using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep.** Veterinary Parasitology, v. 170, p. 318-322, 2010c.

MOURA A. B. et al. ***Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine.** Pesquisa Veterinária Brasileira, rio de Janeiro, 27, 430-434, 2007.

ORTEGA-MORA, L. M. et al. **Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls.** Veterinary Parasitology, Madrid, 117, 301-308, 2003.

OSORO K. et al. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. *Theriogenology*, Madrid, 71, 639-642, 2009.

PARVAR F.F.; KESHAVARS H.; SHOJAEI S. **Detection of *Toxoplasma gondii* antigens in Sera and Urine of Experimentally Infected Mice By Capture ELISA.** *Iranian Journal of Parasitology*, Tehran, v. 3, n.1, p. 1-5, 2008.

PENA, G. O. et al. BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias : aspectos clínicos, de vigilância epidemiológica e de controle.** Guia de bolso. Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. Brasília: DF, 220 p.1998.

POWELL C.C.; BREWER M.; LAPPIN M.R. **Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lacting cats.** *Veterinary Parasitology*, Colorado, 102, 29-33. 2001.

ROCHA, R.J.; TAFURI W.L.; CHIARI C.A. **Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de camundongos durante a fase aguda da infecção experimental.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, 35, 307-313, 1993.

SCARPELLI L. et al. ***Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues,** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, 29, 59-64, 2009.

SERRANO-MARTINEZ, E. et al. **Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and using contaminated semen with different numbers of tachyzoites,** *Theriogenology*, 67, 729-475, 2007.

SKINNER, L.J., et al. **Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family.** *Scandinavian Journal Infectious Diseases*, Inverness, 22, 359–364, 1990.

SPALDING, S. M. et al. **Toxoplasmose.** In: ROSSETTI, M. L. et al. **Doenças infecciosas: diagnóstico molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. Cap. 8, p 102-111, 2006.

SPENCE, J. B. et al. ***Toxoplasma gondii* in the semen of rams.** *The Veterinary Record*, London, 102, 38-39,1978.

TEALE, A. J. et al. **Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma.** The Veterinary Record, London, 17;111(3):53-5.

TENTER, A. M. ***Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, 364-369, 2009.

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

TERRAGNA et al. **The occurrence of *Toxoplasma gondii* in saliva.** Tropenmed Parasitology, Bethesda MD, v. 35, p.9-10, 1984.

VITOR, R.W.A.; PINTO, J.B. e CHIARI, C.A. **Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados,** Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 43, 147-54, abr. 1991.

WONG, S-Y.; REMINGTON, J. S. **Toxoplasmosis in pregnancy.** Clinical Infectious Diseases, Stanford, v. 18, n. 6, p. 853-61, 1994.

ARTIGO 1

Distribuição de *Toxoplasma gondii* em tecidos do sistema reprodutor masculino de camundongos infectados com oocistos da cepa ME49

(Artigo a ser submetido ao Periódico Veterinary Parasitology)

Distribuição de *Toxoplasma gondii* em tecidos do sistema reprodutor masculino de camundongos infectados com oocistos da cepa ME49

RESUMO: Objetivou-se com esse estudo avaliar a presença e distribuição de *T. gondii* no aparelho reprodutor de camundongos machos experimentalmente infectados via oral com distintas doses de oocistos da cepa ME49 na fase aguda da infecção. Vinte e cinco animais foram divididos em cinco grupos: GM1 (n=5) GM2 (n=5) GM3 (n=5), GM4 (n=5) e GC (n=5, Controle) inoculados com 50, 100, 500, 1000 oocistos e solução fisiológica, respectivamente. A comprovação da infecção foi feita por meio da pesquisa de anticorpos e presença de DNA parasitário em sangue, urina e tecidos reprodutivos através da PCR seguida de PCR-Nested. Próstata, vesícula seminal, testículos e epidídimos foram histologicamente avaliados para a pesquisa de lesões sugestivas da infecção. Formas sugestivas de *T.gondii* foram verificadas em urina aos 7° e 15° d.p.i. Na sorologia apenas um animal do GM2 e todos os animais dos GM3 e GM4 apresentaram anticorpos IgM e IgG. Na PCR de sangue não se observou resultados positivos, contudo na PCR-Nested 80% dos animais do GM1 e GM2 foram positivos e os animais do GM3 e GM4 foram negativos. Nenhum animal do GC foi positivo na sorologia e técnicas moleculares. Dos machos dos grupos infectados, 30% apresentaram DNA parasitário em próstata, 40% em testículo e epidídimo e 60% na vesícula seminal. No exame histopatológico observou-se degeneração testicular, infiltrado mononuclear focal e oligospermia mais acentuados nos animais do GM3 e GM4. Essas lesões não foram observadas no GC. Conclui-se que *T. gondii* é eliminado na urina de camundongos experimentalmente infectados com a cepa ME49 na fase aguda da infecção na sua forma infectante. A presença e distribuição do parasita nos diferentes tecidos reprodutivos dos machos sugere que esse possa ser eliminado no sêmen, favorecendo o uso do camundongo no estudo da transmissão venérea de *T. gondii*.

1. Introdução

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório capaz de infectar diversos tipos celulares. Apresenta um complexo ciclo biológico e pode acometer animais homeotérmicos, inclusive o homem (Dubey e Beattie, 1988). Taquizoítos de *T. gondii* são as formas proliferativas do parasita e Tenter et al. (2000) afirmam que essa forma é sensível às condições ambientais e acreditam que a transmissão horizontal envolvendo essa fase de desenvolvimento não seja epidemiologicamente importante, contudo pode ocorrer com baixa frequência.

Em relação ao aparelho reprodutor masculino, alguns autores isolaram *T. gondii* em amostras de sêmen de diversas espécies como caprinos (Dubey e Sharma, 1980; Santana et al., 2010), ovinos (Aganga et al., 1990; Moraes et al., 2010d), bovinos (Scapelli, 2009), suínos (Moura et al., 2007) e coelhos (Liu et al., 2006), além de identificar este agente em tecidos como próstata, vesícula seminal, testículo e epidídimo em bovinos (Scarpelly et al. 2009) e ovinos (Blewett et al., 1982; Lopes, 2007), levantando a possibilidade de transmissão venérea.

Objetivou-se com esse estudo verificar a presença, distribuição e viabilidade de *T. gondii* em tecidos do aparelho reprodutor de camundongos machos Swiss Webster infectados com diferentes doses de oocistos da cepa ME49 por via oral.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado obedecendo aos códigos de ética na experimentação animal aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE (processo n. 23082.010623/2010).

2.1. Animais e Cepa de *Toxoplasma Gondii*

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss Webster, machos com 30 dias de idade, pesando aproximadamente 30g e doados pelo Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu

Magalhães – Cepam/FIOCRUZ-PE, Brasil. Os oocistos da cepa ME49 (genótipo II) foram cedidos pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina – PR, Brasil.

2.2. Grupos experimentais

Foram constituídos cinco grupos experimentais, totalizando 25 camundongos machos assim distribuídos: GM1(n=5), GM2(n=5), GM3(n=5), GM4(n=5) e GC (controle/ n=5), infectados com 50, 100, 500 e 1000 oocistos de *T.gondii*, respectivamente. Os animais do grupo controle foram inoculados com 0,5 ml de solução fisiológica. Todos os animais foram inoculados por via esofágica (gavagem) e monitorados diariamente.

2.3. Eutanásia dos grupos experimentais

Os animais GM1 e GM2 foram eutanasiados aos 15° d.p.i. Os animais dos grupos GM3 e GM4 foram eutanasiados aos 40° d.p.i. Dois machos do grupo controle foram eutanasiados na mesma data que os machos dos grupos G1 e G2 e outros três machos na mesma data que os machos dos grupos GM3 e GM4. A eutanásia de todos os animais foi realizada, utilizando-se pentobarbital sódico intraperitoneal na dose de 240mg/kg de p.v. (FIOCRUZ, 2005).

3. Confirmação da infecção

3.1. Sorologia

Para verificar a soroconversão foi utilizada a técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii*, utilizando-se anticorpos anti-IgG e anti-IgM murino conjugados ao isotiocianato fluoresceína (Sigma®). Os soros foram

diluídos na razão quatro (1:2 até 1:128) de acordo com metodologia descrita por Camargo (1974). Taquizoítos da cepa RH foram utilizados como antígenos na preparação das lâminas.

3.2. *Microscopia e Bioprova*

Foram analisadas amostras de urina de dois machos de cada grupo e do GC aos 7° e 15° d.p.i no GM1 e GM2 e aos 7, 15 e 40 d.p.i no GM3 e GM4. As amostras foram coletadas com auxílio de pipeta automática, após micção espontânea sobre filme plástico estéril e posteriormente observadas em microscópio de campo claro (CX41-OLYMPUS®) em objetiva de 40x. Duas amostras de urina que apresentaram formas sugestivas de taquizoítos foram inoculadas em camundongos (bioprova), após diluição com 1ml de PBS estéril, centrifugação e adição de 1ml de PBS contendo 100 unidades de penicilina/ml e 100µg de estreptomicina/ml sobre o sedimento (Rocha et al., 1993). Os camundongos da bioprova foram eutanasiados aos 15 d.p.i. e o líquido peritoneal e urina foram novamente avaliados à microscopia direta.

3.3. *Detecção de DNA de T. gondii*

Para verificar a presença de DNA de *T. gondii* em amostras de urina, sangue e tecidos do aparelho reprodutor dos machos infectados (GM1, GM2, GM3, GM4 e GC) foi realizada extração de DNA com o kit comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®), conforme o protocolo do fabricante. As reações de amplificação ocorreram após a extração do DNA das amostras e as reações ocorreram em um volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 0,5µL de cada primer a 10µM (TOXO-C 1 e TOXO-N 1); 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega®). O perfil térmico das reações foi feito em termociclador conforme Spalding et al. (2006). O produto das

amplificações foi corado com Blue Green[®] e detectado por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados através de luz ultravioleta para fotodocumentação.

Dos produtos da PCR com resultados negativos, uma alíquota de 1µL foi submetida à PCR-Nested, sendo adicionada a uma mistura de reação em um volume final de 12,5µL contendo 0,5µL de cada primer a 10µM (TOXO C2 e TOXO N2), 4,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega) conforme o protocolo do fornecedor. O ciclo das reações consistiu de desnaturação do DNA inicial a 95°C (4min), seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto para a desnaturação, 62°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e um período de extensão final de 10 minutos a 72°C (SPALDING et al., 2006). Os fragmentos amplificados foram detectados conforme procedimento da PCR.

3.4. *Histopatologia*

Fragmentos de próstata, vesícula seminal, testículo e epidídimos foram fixados em formalina a 10%, desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo (Modelo 1512, Leitz Wetzlar, Germany) e os fragmentos montados em lâmina e corados com hematoxilina-eosina de acordo com Prophet et al. (1992).

4. Resultados

4.1. *Sorologia e detecção de DNA de T. gondii*

Dos animais do GM1 e GM2, apenas um (10%) inoculado com 100 oocistos apresentou imunoglobulinas IgM e IgG. Aos 40 dias, todos os animais do GM3 e GM4 apresentaram anticorpos com título máximo de 128 para IgM e IgG. Os camundongos do GC e aqueles

utilizados na bioprova com amostras de urina não soroconverteram. Todos os animais inoculados, independente da dose e do período da eutanásia apresentaram resultados positivos para presença de DNA parasitário em algum tecido do aparelho reprodutor (Tabela 1). A frequência de detecção foi maior na PCR-Nested quando comparada à PCR.

Na PCR do sangue, apenas um animal do GM1 (20%) foi positivo enquanto que na PCR-Nested observou-se que 80% dos animais do GM1 e GM2 foram positivos. Nenhum animal do GM3 e GM4 foi positivo na PCR e PCR-Nested em amostras de sangue aos 40 d.p.i. Quanto à PCR de vesícula seminal observou-se que 15% das amostras foram positivas. Na PCR-Nested, este percentual foi de 60%. Para a próstata nenhum animal foi positivo na PCR, no entanto, quando analisados na PCR-Nested, 30% das amostras do GM1, GM2, GM3 e GM4 foram positivas.

Amostras de testículos e epidídimos de todos os grupos foram negativas na PCR, porém quando analisadas na PCR-Nested, 40% das amostras foram positivas. Na PCR das duas amostras de urina de cada grupo aos 7 d.p.i., 75% foram positivas e na PCR-Nested esse percentual aumentou para 100%. O mesmo resultado se repetiu aos 15 d.p.i. Das amostras de urina dos GM3 e GM4 aos 40 d.p.i., nenhuma apresentou resultado positivo na PCR e apenas uma amostra de cada grupo totalizando 50% delas foram positivas na PCR-Nested (Tabela 2). Amostras de próstata, testículo, epidídimo, vesícula seminal e urina dos animais do GC foram negativas nas técnicas moleculares.

4.2. Visualização direta de taquizoítos em urina

Aos sete dias apenas uma amostra de urina do GM3 apresentou formas morfológicamente compatíveis com *T. gondii* e aos quinze dias foi possível observar em três amostras (1/GM2, 1/GM3 e 1/GM4). Aos 40 d.p.i os taquizoítos não foram mais visualizados

nas amostras de urina dos animais do GM3 e GM4. A urina dos animais dos grupos controle não apresentou nenhuma forma sugestiva de *T. gondii*.

4.3. *Histopatologia*

No exame histopatológico observou-se degeneração testicular, discreto infiltrado mononuclear focal e oligospermia que foram mais acentuados nos animais do GM3 e GM4.

4.4. *Bioprova de urina*

Os camundongos inoculados com as amostras de urina demonstraram apatia, pelos eriçados e foram positivos na PCR e PCR-Nested da urina e líquido peritoneal. Apenas um animal apresentou anticorpos detectáveis na RIFI.

5. **Discussão**

No presente estudo a não detecção de anticorpos em nove animais dos grupos GM1 e GM2 provavelmente se deu devido à baixa virulência da cepa aliada às menores doses utilizadas nesses grupos, tendo em vista que apenas um animal soroconverteu aos 15 d.p.i. Quando comparados aos animais do GM3 e GM4 que receberam maiores doses de oocistos e foram eutanasiados aos 40 d.p.i. observou-se que 100% deles apresentaram anticorpos detectáveis, demonstrando que a resposta imune dos camundongos infectados sofre influência da dose e do tempo pós-infecção. Sobre esse aspecto Dubey (2010) afirma que os camundongos podem produzir anticorpos contra *T. gondii* entre três e setenta dias após inoculação e em outros experimentos, os anticorpos só foram detectados aos sessenta dias pós-infecção. Além disso, Dubey e Frenkel (1998) relataram que nenhum teste sorológico é definitivo, pois *T. gondii* foi isolado em tecidos de ratos e humanos sem que esses apresentassem anticorpos, mesmo em

baixas diluições do soro. Costa-Silva e Pereira-Chioccola (2010) em experimento com a mesma cepa utilizada neste estudo e com cistos teciduais via oral em camundongos da linhagem AS/n observaram o aparecimento de anticorpos IgM a partir do 7° d.p.i. e os anticorpos da classe IgG surgiram a partir dos 14 d.p.i.

A maioria dos animais dos GM1 e GM2 não apresentou anticorpos detectáveis, no entanto, em todos os animais dos GM3 e GM4 foram verificados anticorpos. Em contrapartida, a parasitemia verificada nas técnicas moleculares só foi detectada nos GM1 e GM2, sugerindo que a presença de anticorpos efetivamente reduziu ou eliminou o parasita do sangue nos animais dos GM3 e GM4, eutanasiados mais tardiamente, independente da dose infetante. De forma semelhante, Costa-Silva e Pereira-Chioccola (2010) verificaram que taquizoítos só foram detectados na PCR em sangue de camundongos inoculados com cistos da cepa ME49 até o 28°d.p.i quando a resposta imune protetora foi estabelecida. Howe e Sibley (1995) observaram que taquizoítos foram detectados no sangue de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa virulenta 76K até o 15° d.p.i, sugerindo a relação entre presença do parasito e ausência ou baixos títulos de anticorpos.

A presença de degeneração testicular, discreto infiltrado mononuclear focal e oligospermia foram os achados anátomo-patológicos mais frequentes no tecido testicular, ocorrendo apenas nos animais do GM3 e GM4. Lu et al. (2005) também descreveram alterações patológicas em testículos, canal deferente e próstata em camundongos na fase aguda da infecção induzida experimentalmente. Terpsidis et al. (2009) verificaram que ratos infectados com *T. gondii* apresentaram alterações dos principais parâmetros reprodutivos, incluindo motilidade espermática, concentração e morfologia. Lopes (2008) em infecção experimental com *T. gondii* na espécie ovina não verificaram alterações em testículos, epidídimos, próstata e vesículas seminais, contudo relataram alterações na qualidade e morfologia do sêmen, mas não as

associaram à infecção por *T. gondii* por se apresentarem aleatórias. Nenhuma alteração sugestiva de infecção foi verificada em próstata e vesícula seminal no exame histopatológico. Por outro lado, ao exame molecular, todos os camundongos apresentaram DNA de *T. gondii* em algum tecido do aparelho reprodutor.

A permanência de taquizoítos na urina na fase aguda neste estudo é um achado importante, pois ainda que Dubey et al. (1998) tenham considerado que esta forma infectante seja frágil no ambiente já foi verificado que, em meios biológicos líquidos, como em soluções salinas, soro, albumina e colostro esta forma pode sobreviver e manter-se infectante entre 24h e vinte e cinco dias, dependendo do meio (Räisänen, 1978). A infectividade do parasita após ser excretado na urina também já foi comprovada anteriormente por Chiari e Neves (1994) por meio da bioprova em camundongos.

A presença e distribuição de *T. gondii* em tecidos do aparelho reprodutor de camundongos é um achado importante e comparável aos encontrados por Moura et al. (2007), Lopes (2008), Scarpelli et al. (2008), Arantes et al. (2010) e Santana et al. (2010), que isolaram e/ou identificaram *T. gondii* em tecidos reprodutivos de suínos, ovinos, bovinos, cães e caprinos respectivamente, independente das doses, formas e vias de administração. Associaram estes achados à presença do parasita em sêmen e à possibilidade de transmissão venérea. As espécies acima estudadas apresentaram o parasita nos mesmos tecidos dos camundongos que foram positivos neste experimento. Com base nessas evidências, acredita-se que camundongos infectados com essa cepa também eliminem *T. gondii* no sêmen, podendo servir de modelos para estudar a transmissão venérea experimental.

Outro resultado importante se refere à vesícula seminal por ser uma das glândulas que mais contribuem com o conteúdo do ejaculado. Neste experimento, aparentemente, a maior frequência (60%) de detecção de *T. gondii* sugeriu maior afinidade do parasita por este tecido

quando comparado ao testículo e epidídimo (40%) e próstata (30%). Lopes et al. (2008) e Sacarpelli et al. (2008) descreveram parasitismo em vesícula seminal de ovinos e bovinos respectivamente, sendo que em bovinos este tecido apresentou frequência elevada tanto quanto o tecido prostático.

As técnicas moleculares utilizadas mostraram-se ferramentas de diagnóstico importantes para detectar o agente em amostras de tecidos de animais negativos na sorologia. A PCR-Nested ainda possibilitou o diagnóstico em amostras negativas na primeira PCR, certamente devido à sua maior especificidade e sensibilidade (Kopalic-Cristo, 2005; Spalding et al., 2002). A PCR e PCR-Nested tem contribuído muito na verificação da presença de *T. gondii* em secreções orgânicas como sêmen (Moraes et al., 2010c; Moraes et al., 2010d), urina (Fuentes et al., 1996; Shojaee e Keshavarz, 2007) e leite (Kim et al., 2010).

T. gondii foi ainda detectado em líquido peritoneal e urina de dois dos quatro camundongos na bioprova através da PCR e PCR-Nested, demonstrando sua infectividade na urina de acordo com o verificado por Chiari e Neves (1994).

6. Conclusão

Conclui-se que *T. gondii* é eliminado na urina de camundongos experimentalmente infetados com a cepa ME49 na fase aguda da infecção na sua forma infectante. A presença e distribuição do parasita nos diferentes tecidos reprodutivos dos machos sugere que esse possa ser eliminado no sêmen, favorecendo o uso do camundongo no estudo da transmissão venérea de *T. gondii*.

7. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Cnpq, pelo financiamento desta pesquisa.

6. Referências

Aganga A.O., Umoh J.U., Kyewalabye E.K. e Ekwempu C.C. 1988. Comparative experimental transmission studies with Nigerian isolates and TS-I strain of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Journal Animal Production Research*, 8:104-120.

Blewett, D. A., Teale, A. J., Miller, J. K., Scott, G. R. and Buxton, D. 1982. Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. *The Veterinary Record*, Edinburgh, 24:73-75, 1982.

Camargo, M. E., 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, São Paulo, v. 10, 143-169.

Chiari, C.A. e Neves, D.P. 1984. Toxoplasmose aguda adquirida através do leite de cabra. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 79(3):337-340.

Costa-silva T.A, Pereira-chioccola V.L. 2010. Fase aguda da infecção por *Toxoplasma gondii*: avaliação do parasitismo sanguíneo e resposta humoral em camundongos isogênicos AS/n. *Scientia Medica*, Porto Alegre, volume 20, número 1, p. 88-92.

Dubey J. P., Lindsay D. S., e Speer C. A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue. *Clinical Microbiology Reviews*, Bozeman, Montana, p. 267–299.

Dubey J.P. e Frenkel J.K. 1998. Review. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology*, Beltsville, 77: 1–32.

Dubey, J. P. e Beattie. C. P. 1988. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton, Fla.: 220 p.: ill. ; 27 cm.

Dubey, J. P., 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd ed. Rev. ed. of: *Toxoplasmosis of animals and man* / authors, J.P. Dubey, C.P. Beattie, c1988. CRC Press, Boca Raton, p.388.

Dubey, J. P.; Sharma, S. P., 1980. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. *American Journal of Veterinary Research*, Saint Louis, 41, 794-795.

Fuentes, I., M. Rodriguez., Domingo CJ, F. Castillo, T. Juncosa and Alvar J., 1996. Amostra de urina utilizada para o diagnóstico da toxoplasmose congênita e por PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 34: 2368-2371.

Howe DK, Sibley LD. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal Infectious Disease*. St. Louis, 172:1561–6.

Kompalic-Cristo, A., Britto, C., Fernandes, O., 2005. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial*, Rio de Janeiro, 41, 229-35.

Liu SG, Qin C, Yao ZJ e Wang D. 2006, Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, Xinxiang, Jun; 24(3):166-70.

Liu SG.; Zhang HZ.; Li X.; Zhang Z. e Hu B. 2006. Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits enfected with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Chinese Medical Journal*, Xinxiang, 119(8):701-704.

Lopes W. D. Z., Costa A. J., Souza F. A, Rodrigues J. D. F., Costa G. H. N., Soares V.E. e Silva G.S. 2009. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Animal Reproduction Science*, Botucatu, 111:312-319.

Lopes W.D.Z. 2007. Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (*Ovis aries*) machos experimentalmente infectados. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Botucatu, p. 74.

Lu, M., Yang, L.D., Chen, C.Y., Wu, X.Z., Gong, F., 2005. Infertility experiment on male mice infected with *Toxoplasma* (In Chinese with English abstract). *Chinese Journal of Zoonoses*, 21, 592–594.

M.S. Fundação Oswaldo Cruz, 2005. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Org.: Paiva F.P.; Maffili V.V. e Santos A.C.S. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. Acesso: 10/03/2009.

Moraes E. P. B. X. et al. 2010. Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, 30 (11): 915-917.

Moura, A. B., Costa, A. J., Jordão Filho, S., Paim, B. B., Pinto, F. R. and Di Mauro, D. C. 2007. *Toxoplasma gondii* in sêmen of experimental infected swine, Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, 27: 430-434.

Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, Washington.

Räisänen S.A. e Saari K.M. 1978. The importance of trophozoites in transmission of toxoplasmosis: Survival and pathogenity of *Toxoplasma gondii* trophozoites in liquid media. Medical Hypotheses, Finlândia, v.4, p. 367-375.

Rocha, R.J.; Tafuri, W.L. e Chiari, C.A. 1993. Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de camundongos durante a fase aguda da infecção experimental. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, 35(4): 307-313.

Santana L., Costa A., Pieroni J, Lopes W., Santos R., Oliveira G., Mendonça R., Sakamoto C. 2010. Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats, Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 179-182, jul.-set. 2010.

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

Shojaee S.;Rezaie S.; Keshavarz H. 2007. Detection of *Toxoplasma gondii* from sera and urine of experimentally mice by PCR. Pakistan Journal of Biological Sciences, Tehran, 1:10(1):193-5.

Spalding, S. M; Angel, S. O.; Amendoeira, M. R. R. 2006. Toxoplasmose. In: Rossetti, M. L; Silva, C. M. D.; Rodrigues, J. J. S. (eds.), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular (Brasil, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), 102-111.

Tenter A.M., Anja R. Heckeroth e Louis M. Weiss, 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology, Hannover, 31, p.217-220.

Terpsidis K.I., Papazahariadou M.G., Taitzoglou I.A., Papaioannou N.G., Georgiadis M.P. e Theodoridis I.T. 2009. *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in experimentally infected male rats. Experimental Parasitology, Atenas, 121:238-241.

Tabela 1: Resultado da PCR e PCR-Nested para pesquisa de *T. gondii* em tecidos reprodutivos de camundongos infectados com a cepa ME49.

Grupos	Técnica	Amostra de tecido			
		S	V S	P	TE
GM1(n=5)	PCR	1/5	1/5	0/5	0/5
	NESTED	4/5	4/5	1/5	3/5
	(%) PCR	20%	20%	0%	0%
	(%) PCR-N	80%	80%	20%	60%
GM2 (n=5)	PCR	0/5	1/5	0/5	0/5
	NESTED	4/5	5/5	2/5	3/5
	(%) PCR	0%	20%	0%	0%
	(%) PCR-N	80%	100%	40%	60%
GM3(n=5)	PCR	0/5	0/5	0/5	0/5
	NESTED	0/5	1/5	1/5	1/5
	(%) PCR	0%	0%	0%	0%
	(%) PCR-N	0%	20%	20%	20%
GM4(n=5)	PCR	0/5	1/5	0/5	0/5
	NESTED	0/5	2/5	2/5	1/5
	(%) PCR	0%	20%	0%	0%
	(%) PCR-N	0%	40%	40%	20%
GC (n=5)	PCR	0/5	0/5	0/5	0/5
	NESTED	0/5	0/5	0/5	0/5
	(%) PCR	0%	0%	0%	0%
	(%) PCR-N	0%	0%	0%	0%

S- sangue; VS- Vesícula Seminal; P- Próstata; TE- Testículo e epidídimo

Tabela 2. Resultados da PCR e PCR-nested de urina em três momentos.

Grupos		Amostras urina positivos/n total		
		7 .p.i.	15 d.p.i	40 d.p.i
G1 (n=2)	PCR	1/2	2/2	-
	NESTED	2/2	2/2	-
G2 (n=2)	PCR	2/2	1/2	-
	NESTED	2/2	2/2	-
G3(n=2)	PCR	2/2	2/2	0/2
	NESTED	2/2	2/2	1/2
G4(n=2)	PCR	1/2	0/2	0/2
	NESTED	2/2	2/2	1/2
GC (n=2)	PCR	0/2	0/2	0/2
	NESTED	0/2	0/2	0/2

ARTIGO 2

Transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* em fêmeas de camundongos Swiss Webster acasaladas com machos inoculados com oocistos da cepa ME49

(Artigo a ser submetido ao Periódico Veterinary Parasitology)

Transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* em fêmeas de camundongos Swiss Webster acasaladas com machos inoculados com oocistos da cepa ME49

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo verificar a transmissão venérea de *T. gondii* e os distúrbios reprodutivos em fêmeas de camundongos acasaladas com machos experimentalmente infectados por via oral com oocistos da cepa ME49. Vinte machos foram divididos em quatro grupos: GM1 (n=5) GM2 (n=5) GM3 (n=5) e GM4 (n=5) e inoculados com 50, 100, 500 e 1000 oocistos, respectivamente. Quarenta fêmeas foram divididas em quatro grupos (GF1, GF2, GF3 e GF4) e apresentadas aos machos por um período de sete dias (2° - 14°d.p.i.) na proporção de duas fêmeas para cada macho. Dez fêmeas foram apresentadas a cinco machos não inoculados (controle). A infecção foi confirmada nas fêmeas por meio da pesquisa do DNA parasitário em amostras de tecidos do aparelho reprodutor. Quinze por cento (6/40) das fêmeas apresentaram DNA parasitário em pool de tecidos ovariano e uterino na PCR e setenta e cinco por cento (30/40) foram positivas na PCR-Nested. Dez por cento, 60%, 20% e 20% das fêmeas dos GF1, GF2, GF3 e GF4, respectivamente não pariram e foram observados distúrbios reprodutivos nas fêmeas dos grupos GF3 e GF4. A maior parte das amostras de pool de tecidos fetais (cérebro e vísceras) foi positiva no exame molecular e fetos de uma mesma ninhada apresentaram resultados positivos e negativos. Conclui-se que *T. gondii* é transmitido por via venérea em camundongos infectados com a cepa ME49.

1. Introdução

O protozoário *Toxoplasma gondii* é capaz de infectar todos os animais de sangue quente, porém, as consequências da infecção são muito variáveis entre diferentes espécies de animais (INNES, 1997).

O taquizoíto é a forma de proliferação rápida de *T. gondii* (Dubbey, 1998) e pode ser encontrado em várias secreções orgânicas como em leite (Riemann et al., 1975; Sacks, Ronald e Brooks, 1982; Chiari e Neves, 1984; Skinner et al., 1990) e saliva (Chiari e Neves, 1984; Vitor, pinto e Chiari, 1991). No sêmen, também foi encontrado em várias espécies domésticas como caprinos (Dubey e Sharma, 1980; Santana et al., 2010), ovinos (Spence et al., 1978; Blewett et al., 1982; Aganga et al., 1990; Lopes et al., 2007; Lopes et al., 2009; Moraes et al., 2010), bovinos (Scapelli et al., 2009), suínos (Moura et al., 2007) e coelhos (Liu et al., 2006) e a possibilidade de transmissão venérea do agente tem sido discutida.

Liu et al. (2006), Moraes et al. (2009), Santana et al. (2010) e Arantes et al. (2010) verificaram distúrbios reprodutivos e soroconversão em fêmeas das espécies leporina, caprina, ovina e canina, respectivamente, inseminadas com doses de sêmen contaminadas com taquizoítos, além de verificar a transmissão congênita. No entanto, não há na literatura, referências que comprovem a transmissão de *T. gondii* por meio da cópula.

A importância do modelo murino no estudo da toxoplasmose foi relatada por vários autores. Innes (1997) afirmou que o camundongo tem sido largamente utilizado no estudo da toxoplasmose congênita onde em geral as fêmeas são desafiadas durante algum período da gestação. No entanto, se refere à dificuldade de comparar resultados das diferentes pesquisas tendo em vista a diversidade de cepas e formas do parasito e de linhagens de camundongos utilizados nos diferentes estudos.

Objetivou-se com este estudo investigar a transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* em camundongas acasaladas com machos infectados experimentalmente com diferentes doses de oocistos via oral. Diferente dos outros estudos realizados anteriormente, esse estudo é pioneiro no que se refere à transmissão venérea nessa espécie.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil (processo n. 23082.010623/2010).

2.1. Animais e cepa de Toxoplasma gondii

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss Webster*, machos e fêmeas, com 30 dias de idade, pesando aproximadamente 30g e doados pelo Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Cpam/FIOCRUZ-PE, Brasil.

Para a infecção experimental foram utilizados oocistos da cepa ME49 cedidos pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina – PR, Brasil.

2.2. Grupos experimentais

Vinte camundongos machos foram divididos em quatro grupos: GM1 (n=5) GM2 (n=5) GM3 (n=5) e GM4 (n=5) e inoculados com 50, 100, 500 e 1000 oocistos, respectivamente. Os animais foram inoculados por via esofágica (gavagem) com solução fisiológica com e sem oocistos e monitorados diariamente.

Quarenta fêmeas foram divididas em quatro grupos (GF1, GF2, GF3 e GF4) e acasaladas com os machos na proporção de duas fêmeas para cada macho. A primeira fêmea foi

apresentada entre o 2° e 8° d.p.i. e a segunda fêmea entre o 6° e 13°d.p.i. Dez fêmeas foram mantidas com cinco machos não inoculados (grupo controle).

2.3. Eutanásia

Os camundongos machos dos grupos GM1 e GM2 foram eutanasiados aos 14-15° d.p.i. e aqueles dos grupos GM3 e GM4 aos 39-40° d.p.i.; três machos do grupo controle foram eutanasiados na mesma data que os machos dos grupos GM1 e GM2 e outros dois machos na mesma data que os machos dos grupos GM3 e GM4. Todas as fêmeas foram eutanasiadas aos 42 d.p.i. A eutanásia de todos os animais foi realizada conforme preconiza Fiocruz (2005), utilizando-se pentobarbital sódico intraperitoneal na dose de 240mg/kg de p.v. Dois natimortos da mesma ninhada de duas fêmeas de cada grupo (GF2, GF3 e GF4) e dois nascidos vivos de duas fêmeas do GF1 foram submetidos à pesquisa de DNA parasitário em pool de tecidos cerebral e abdominal.

3. Confirmação da infecção

3.1. Sorologia

Para verificar a soroconversão de machos, fêmeas e suas respectivas crias foi utilizada a técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii*, utilizando-se anticorpos anti-IgG e anti-IgM-murino conjugados ao isotiocianato fluoresceína (Sigma®). Os soros foram diluídos na razão quatro (1:4 até 1:128) de acordo com metodologia descrita por Camargo (1974). Taquizoítos da cepa RH foram utilizados como antígenos na preparação das lâminas.

3.2. Detecção de DNA de *T. gondii*

Para verificar a presença de DNA de *T. gondii*, amostras de sangue dos grupos de machos e tecidos do aparelho reprodutor, pool de tecidos uterino e ovariano de fêmeas, bem como pool de cérebro e vísceras abdominais de neonatos, foram coletadas e submetidas a extração de DNA com kit comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®), conforme o protocolo do fabricante. As reações de amplificação ocorreram após a extração do DNA das amostras e as reações ocorreram em um volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 0,5µL de cada primer a 10µM (TOXO-C 1 e TOXO-N 1); 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega®). O perfil térmico das etapas de reações foram feitas em um termociclador e seguido de acordo com o protocolo descrito em Spalding et al. (2006). Os fragmentos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Blue Green® e visualizados através de luz ultravioleta para fotodocumentação.

Amostras negativas e controles foram submetidos a PCR-Nested, utilizando 1µL do produto do PCR simples e adicionado à mistura de reação em um volume final de 12,5µL contendo 0,5µL de cada primer a 10µM (TOXO C2 e TOXO N2), 4,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega) conforme o protocolo do fornecedor. O ciclo das reações consistiu de uma desnaturação do DNA inicial a 95°C (4min) e seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto para a amplificação, 62°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e um período de extensão final de 10 minutos a 72°C após adaptação do protocolo descrito em Spalding et al. (2006). Os fragmentos amplificados foram detectados conforme no procedimento da PCR.

3.3. Histopatologia

Amostras de útero e ovário foram fixadas em formalina a 10% e posteriormente foram cortadas e submetidas à desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo (Modelo 1512, Leitz Wetzlar, Germany) e os fragmentos montados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina de acordo com Prophet et al. (1992).

4. Resultados

4.1. Distúrbios reprodutivos

Nesse trabalho observou-se a ocorrência de manifestações clínicas indicativas de gestações patológicas como ganho seguido de perda de peso nas fêmeas no primeiro terço da gestação, ocorrência de natimortos, distocia e atonia uterina ao parto, sangramento vaginal durante a gestação, distúrbios do desenvolvimento fetal e falta de uniformidade entre os fetos ao nascimento.

Verificou-se que algumas fêmeas de todos os grupos que não pariram tiveram ligeiro ganho de peso no primeiro terço da gestação seguido de perda de peso até o terço médio da gestação, indicando possível morte e reabsorção embrionária. Esse evento não foi observado nas fêmeas do grupo controle que apresentaram ganho de peso progressivo até o parto.

Nas fêmeas do GF1 não foi observada a ocorrência de natimortos e 10% delas não pariu. Por outro lado, no grupo de fêmeas do GF2, 40% das fêmeas não pariram e em 20% observou-se a ocorrência de natimortos. Oitenta por cento das fêmeas dos grupos GF3 e GF4 não pariram e 20% entrou em trabalho de parto, sem êxito, apresentando distocia seguida de atonia uterina, sendo eutanasiadas.

O número médio de nascidos foi de 9,9 filhotes/fêmea no GF1, 7,5 no GF2, 2,8 no GF3 e 2,8 no GF4. No grupo controle o número médio de nascidos por fêmea foi de 10,6, tendo em

vista que todas pariram normalmente. Aproximadamente 50% das fêmeas de todos os grupos apresentaram pêlos eriçados na primeira semana após o acasalamento, permanecendo aparentemente saudáveis durante o restante do período gestacional. Uma fêmea do grupo GF1 apresentou emagrecimento progressivo durante a fase de amamentação, vindo a óbito aos 23 dias após o parto. Alguns fetos das fêmeas dos GF3 e GF4 apresentaram-se autolisados, além de ser verificada marcada congestão uterina nas fêmeas eutanasiadas.

4.2. Sorologia

Observou-se soroconversão (IgM e IgG) em apenas um macho do GM2 e em todos do GM3 e GM4 com títulos de anticorpos variando 4 até 128. Não foi observada soroconversão em nenhuma fêmea de todos os grupos e seus respectivos filhotes.

4.3. Diagnóstico molecular

Oitenta por cento dos animais dos grupos GM1 e GM2 apresentaram DNA parasitário em sangue. Nenhum dos machos dos grupos GM3 e GM4 apresentou DNA parasitário em sangue. Os animais do GC não apresentaram DNA parasitário em sangue e tecidos reprodutivos.

A PCR foi positiva em 10% (n=1) das amostras de útero e ovário das fêmeas do GF1 e GF2. Na PCR-nested das fêmeas desses grupos observou-se percentuais de 100% e 90% para os mesmos tecidos analisados, respectivamente. No GF3, 30% (n=3) dos úteros e ovários foram positivos na PCR e 60% (n=6) na PCR-Nested e no GF4, 20% (n=2) e 40% (n=4) foram positivos na PCR e PCR-Nested, respectivamente. Na análise dos fetos observaram-se animais positivos e em alguns casos, fetos de uma mesma ninhada apresentaram resultados positivos e negativos na PCR e PCR-Nested (Tabela 1).

4.4. Histopatologia

Nos cortes histológicos de úteros e ovários observaram-se que em 40% das fêmeas de todos os grupos observou-se hiperplasia e metaplasia epitelial associadas à marcada infiltração polimorfonuclear e mononuclear dispostas de forma focal e adjacentes à mucosa uterina, além de foco de necrose intersticial no miométrio. Em corte de tecido cerebral, uma fêmea do GF3 apresentou foco de infiltrado mononuclear no córtex cerebral adjacente à meninge. Pneumonia intersticial mononuclear difusa também foi observada em uma fêmea do GF1. Nenhuma dessas alterações foi observada nas fêmeas do GC.

5. Discussão

Alguns pesquisadores consideraram a via venérea como potencial para disseminação de *T. gondii* por terem comprovado a presença de taquizoítos viáveis em sêmen de machos de diversas espécies e/ou por terem verificado a ocorrência de diversos distúrbios reprodutivos em fêmeas inseminadas artificialmente com sêmen contaminado (Dubey e Sharma, 1980; Blewett et al., 1982; Aganga et al., 1990; Liu et al., 2006; Moura et al., 2007; Lopes, 2007; Scapelli, 2009; Moraes et al., 2010a; Moraes et al., 2010b; Moraes et al., 2010c; Arantes et al., 2010; Santana et al., 2010).

Sobre a transmissão venérea do *T. gondii* não se verificou na literatura trabalhos que comprovem essa via de transmissão. Os estudos realizados até o momento que sugeriram a via de transmissão venérea foram realizados a partir da inoculação intraperitoneal de taquizoítos nos machos ou da contaminação do sêmen com diferentes doses de taquizoítos no momento da inseminação. Liu et al. (2006) inocularam taquizoítos por via intraperitoneal da cepa RH em coelhos e coletaram e armazenaram sêmen dos animais que sobreviveram para posterior inseminação de coelhas. Nesse estudo, não houve cópula e as fêmeas foram infectadas por via

vaginal com doses sucessivas de taquizoítos. Arantes et al. (2010), também procederam a inseminação artificial (IA) em cadelas com doses de sêmen contaminadas com a mesma forma infectante e cepa anteriormente citada e também não realizaram a cópula.

Moraes et al. (2010) realizaram a contaminação do sêmen de ovinos com diferentes doses de taquizoítos seguido de IA por via transabdominal por laparoscopia em ovelhas, utilizando a cepa CPG, genótipo III e verificaram distúrbios reprodutivos como reabsorção embrionária, natimortalidade e abortos entre outros.

Em camundongos, Cowen e Wolf (1950a, 1950b, 1950c) realizaram infecção de fêmeas via vaginal com material embebido com solução cerebral de camundongos infectados e consideraram que a vagina pode ser uma porta de entrada para *T. gondii*. No presente estudo, a via de entrada do parasito foi o trato reprodutivo da fêmea através do coito espontâneo com machos infectados por via oral com oocistos da cepa ME49, simulando uma provável via de infecção natural.

Tendo em vista os resultados obtidos neste experimento como a ocorrência de patologias reprodutivas nas fêmeas dos diferentes grupos, assim como os resultados obtidos na PCR e histopatológico dos órgãos analisados, alguns aspectos são relevantes e devem ser considerados. A virulência da cepa, a via de inoculação, o estado imunológico da fêmea à concepção, as propriedades imunossupressoras do plasma seminal e o número de parasitos excretados no sêmen durante o período receptivo da fêmea, são especialmente importantes.

No presente estudo, nenhuma das fêmeas dos grupos apresentou anticorpos detectáveis na RIFI aos 42 d.p.i. O resultado negativo na sorologia para fêmeas dos grupos estudados não descarta a infecção desses animais, pois verificou-se a presença do DNA parasitário em amostras dos órgãos reprodutivos que confirmam a infecção.

Dubey (2010) afirma que os camundongos podem produzir anticorpos contra *T. gondii* entre três e setenta dias após inoculação; em outros experimentos, os anticorpos só foram detectados aos sessenta dias p.i. Além disso, em se referindo à soroconversão em ratos, Dubey e Frenkel (1998) relataram que nenhum teste sorológico é definitivo, pois *T. gondii* foi isolado em tecidos de ratos e humanos sem que esses apresentassem anticorpos, mesmo em baixas diluições do soro. Nos machos também se verificou comportamento de resposta imune humoral semelhante, pois no GM1 e GM2 eutanasiados aos 15 d.p.i. foram detectados anticorpos em apenas um animal. Em contrapartida nos machos do GM3 e GM4 eutanasiados aos 42 d.p.i. observou-se resposta de anticorpos em 100% das amostras.

Sedlačková et al. (2001) também verificaram que 7/49 ratos silvestres da Eurásia (*Microtus arvalis*) não apresentaram anticorpos após inoculação oral com oocistos quando examinados pelos testes do corante de Sabin-Feldman (DT) e de Aglutinação em Látex (LAT). Wallace (1973) verificaram que 6/10 ratos de um grupo inoculado com trinta oocistos da cepa WC-306 não soroconverteram e quando estes foram novamente desafiados com doses superiores produziram anticorpos. Em outros casos pode ocorrer a soroconversão sem que nenhum sinal clínico seja verificado (Ito et al., 1975) o que demonstra a variabilidade das manifestações nas relações hospedeiro-parasito.

No presente estudo, embora a maioria das camundongas tenha apresentado DNA parasitário em pool de tecidos reprodutivos, ocasionalmente, observou-se a ocorrência de filhotes negativos e positivos na PCR-Nested em uma mesma ninhada. Segundo Pfaff e Candolfi (2008), os mecanismos envolvidos no controle da transmissão materno-fetal da toxoplasmose ainda permanecem quase desconhecidos.

A ocorrência de filhotes da mesma ninhada apresentando resultados positivos e negativos ao exame molecular, possivelmente tem relação com o fato de as placentas de ratos

serem independentes (Zenner et al., 1993) e dessa forma possa explicar a razão pela qual fetos da mesma ninhada não estiveram todos infectados. A literatura médica também se refere à ocorrência de fetos humanos dizigóticos com toxoplasmose congênita verificada através de testes sorológicos e oriundos de gestação gemelar onde a infecção foi observada em apenas um dos gêmeos (Crouver et al., 1976; Falavigna et al., 2007).

A reação imune da mucosa do hospedeiro frente a antígenos de *T. gondii* foi descrita por McLeod e Mack (1986). Neste caso a mucosa estudada foi a do trato gastrointestinal de camundongos. Os pesquisadores observaram a ocorrência de produção de IgA específica (ELISA) em secreção intestinal quando da inoculação oral de cistos da cepa ME49 a mesma utilizada neste estudo. Resultados semelhantes também foram obtidos por Hafid et al. (2005) que verificaram a presença de anticorpos IgA (ELISA) em fezes de camundongos a partir dos 12 d.p.i. que persistiram até os 49 d.p.i. Em contraste, estes anticorpos não foram identificados em soro sanguíneo e IgM e IgG só foram detectados a partir dos 19 d.p.i. em uma minoria dos animais.

A não detecção de IgM e IgG no soro das fêmeas no presente estudo pode ter sido em parte devido ao controle da infecção no sítio de invasão do parasito, nas mucosas vaginal e uterina com a possível atuação de IgA produzida localmente, associada à ação da imunidade celular e a baixa virulência da cepa. De acordo com Dubey e Frenkel (1998), a infecção e a doença clínica podem variar conforme a cepa de *T. gondii*, o estágio infectante da cepa e a via de transmissão utilizada. A cepa ME49 está classificada como tipo II e apresenta baixa patogenicidade para camundongos e a infecção por ela causada resulta em infecção crônica (Sibley e Boothroyd, 1992; Freyre et al., 2001). Freyre et al. (2001) verificaram que alguns neonatos de ratas infectadas oralmente com oocistos dessa cepa não demonstraram infecção nos resultados obtidos na bioprova e sorologia.

Os resultados positivos em menor frequência na PCR e maior na PCR-Nested sugerem uma relação com a carga parasitária, uma vez que as fêmeas dos GF1 e GF2 provavelmente receberam menor dose no ato do acasalamento, diferentemente de algumas fêmeas do GF3 e GF4 que provavelmente receberam maior dose e dessa forma foram positivas na primeira PCR.

Os resultados obtidos na PCR-nested para fêmeas dos grupos estudados (60% para GF3 e 40% para GF4; 100% e 90% para GF1 e GF2, respectivamente) se devem provavelmente ao fato de alguns machos que receberam maior dose do parasito não conseguiram copular devido ao seu estado geral após a infecção e dessa forma as fêmeas não foram acasaladas.

Um outro ponto a ser elucidado refere-se à rota de infecção de *T. gondii* após sua introdução no trato reprodutivo da fêmea murina. Os achados em tecidos de útero e ovários demonstraram que houve a infecção das fêmeas, no entanto, ainda não foi possível saber se o parasito infectou os embriões antes de sua implantação no útero.

Dados gerais sobre a sensibilidade e especificidade da PCR sugerem que esta é uma técnica extremamente útil para o diagnóstico da toxoplasmose na medicina humana e veterinária (James e Gajadhar, 1993). Muitos trabalhos comprovaram a viabilidade da aplicação da PCR por sua alta sensibilidade, comparando esta técnica com outros métodos de diagnóstico. Dabritz et al. (2007) verificaram que essa técnica obteve sucesso na detecção de DNA parasitário em tecidos murinos quando comparada à imunohistoquímica, observando que a PCR demonstrou ser altamente sensível e segura na pesquisa de DNA de *T. gondii*.

Em relação aos resultados obtidos na PCR-Nested que demonstrou um alto percentual de amostras positivas em fêmeas murinas, está de acordo com as observações feitas por Sache (2004) que afirmaram que a PCR-Nested favorece a resolução de problemas na detecção do DNA por utilizar primers internos aos usados nos primeiros ciclos de amplificações na PCR, sendo esta, sempre mais suscetível às interferências de DNA do hospedeiro em excesso nas

amostras clínicas iniciais ou à inibidores da DNA polimerase, o que torna a PCR-Nested mais específica e sensível que a própria PCR.

Ainda em relação às divergências de resultados observados entre a técnica sorológica e molecular, Owen e Tress (1998) também verificaram que camundongos filhos (F1) de mães infectadas demonstraram maior positividade quando examinados por PCR e bioprova do que na pesquisa para anticorpos, sugerindo que o teste sorológico utilizado, Teste de Aglutinação Modificado (MAT), não refletiu o estado real da infecção por *T. gondii*.

As lesões inflamatórias focais e necrose, adjacentes à mucosa e submucosa uterina de algumas fêmeas do GF1, GF2, GF3 e GF4 podem sugerir uma resposta imune inespecífica ao parasito. Roberts et al. (2008) relataram que as relações que envolvem a ação do parasita sobre placenta e feto e a atuação do sistema imune no período gestacional não estão completamente elucidadas. O complexo sistema imune uterino e sua compreensão é a chave para resolução de muitos problemas relativos à saúde reprodutiva da fêmea e os princípios que regem a tolerância e a imunidade na mucosa do sítio uterino são semelhantes aos dos outros tecidos de mucosas (Robertson, 2000).

6. Conclusão

Conclui-se que *Toxoplasma gondii* é transmitido por via venérea em camundongos experimentalmente infectados com a cepa ME49 sendo capaz de provocar distúrbios reprodutivos em fêmeas e infectar sua progênie.

7. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Cnpq, pelo financiamento dessa pesquisa.

Referências

Aganga A.O., Umoh J.U., Kyewalabye E.K. and Ekwempu C.C. 1988. Comparative experimental transmission studies with Nigerian isolates and TS-I strain of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Journal Animal Production Research*, 8:104-120.

Blewett, D. A., Teale, A. J., Miller, J. K., Scott, G. R. and Buxton, D. 1982. Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. *The Veterinary Record*, Edinburgh, 24:73-75, 1982.

Cowen D., Wolf A. 1950a. Experimental congenital toxoplasmosis I. The vagina as a portal of entry of toxoplasma in the mouse, *The Journal of Experimental Medicine*, Nova York, 92(5): 393–402, 31 October.

_____. 1950b. Experimental congenital toxoplasmosis: II. Transmission of toxoplasmosis to the placenta and fetus following vaginal infection in the pregnant mouse. *The Journal of Experimental Medicine*, Nova York, 92(5): 403–416.

_____. 1950c. Experimental congenital toxoplasmosis. III. Toxoplasmosis in the offspring of mice infected by the vaginal route. Incidence and manifestations of the disease. *The Journal of Experimental Medicine*, Nova York, 1;92(5):417–429.

Camargo, M. E., 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Revista Brasileira de Patologia Clínica, 276 São Paulo. 10, 143-169.

Chiari, C.A. e Neves, D.P. 1984. Toxoplasmose aguda adquirida através do leite de cabra. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 79(3):337-340.

Couvreur, J.,Desmonts, G. e Girre, J.Y. 1976. Congenital toxoplasmosis in twins: a series of 14 pairs of twins: absence of infection in one twin in two pairs. The Journal of Pediatrics, Cincinnati, 89: 235-240.,

Dabritz H.A., Miller M.A., Packham A.E., Rejmanek D, Leutenegger CM, Gardner IA, Atwill ER, Patricia A C. 2007. Experimental infection of *Peromyscus californicus* with *Toxoplasma gondii*. The Journal of Parasitology, Davis, 93(6):1360-4.

Dubey J.P., Frenkel J.K. 1998. Review. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. Veterinary Parasitology, Beltsville, 77: 1–32.

Dubey, J. P., Beattie. C. P. 1988. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, Fla.: 220 p.: ill. ; 27 cm.

Dubey, J. P., 2010. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. Rev. ed. of: Toxoplasmosis of animals and man / authors, J.P. Dubey, C.P. Beattie, c1988. CRC Press,Boca Raton, p.388.

Dubey, J. P., Sharma, S. P., 1980. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. American Journal of Veterinary Research, Saint Louis, 41, 794-795.

Falavigna, D.L.M., Roncada, E.V., Nakazora, D., Pelloso, M.C., Falavigna, L.F.M., de Araújo, S.M. e Falavigna-Guilherme A.L. 2007. Case Report. Congenital Toxoplasmosis in Dizygotic Twins, Paraná, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, S.Paulo, 49(2): 117-118.

Freyre A.; Correa O., Failcón J.; Mendez J., González M e Venzal J.M. 2001. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. Parasitology Research, 87: 941-944.

Hafid J., Flori P., Raberin H., Tran Manh Sung R. 2001. Comparison of PCR, capture ELISA and immunoblotting for detection of *Toxoplasma gondii* in infected mice. Journal for Medicine Microbiology, England, 50, 1100-4.

Ito, S., Tsunoda, K., Nishikawa, H. e Matsui, T. 1975. Pathogenicity for several laboratory animals of *Toxoplasma* oocysts originated from naturally infected cats. National Institute of Animal Health Quarterly, Tokyo, 15, 122-127.

Liu SG, Qin C, Yao ZJ e Wang D. 2006b, Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, Xinxiang, Jun;24(3):166-70.

Liu SG.; Zhang HZ., Li X.; Zhang Z. e Hu B. 2006a. Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits enfected with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Chinese Medical Journal, Xinxiang, 119(8):701-704.

Lopes W. D. Z., Costa A. J., Souza F. A, Rodrigues J. D. F., Costa G. H. N., Soares V.E. e Silva G.S. 2009. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Animal Reproduction Science, Botucatu, 111:312-319.

Lopes W.D.Z. 2007. Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (*Ovis aries*) machos experimentalmente infectados. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Botucatu, p. 74.

M.S. Fundação Oswaldo Cruz, 2005. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Org.: Paiva F.P.; Maffili V.V. e Santos A.C.S. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. Acesso: 10/03/2009.

MacPherson J.M., Gajadhar A.A. 1993. Sensitive and Specific Polymerase Chain Reaction Detection of *Toxoplasma gondii* for Veterinary and Medical Diagnosis. Canadian Journal Veterinary Research, Canadá, 57: 45-48.

McLeod R., Mack D.G. 1996. Secretary IgA specific for *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology. Baltimore, 1;136(7): 2640–2643.

Menzies F. M., Henriquez F. L., Roberts C. W. 2008. Review Immunological control of congenital toxoplasmosis in the murine model. *Immunology Letters*, Roma, 115, 83-89.

Moura, A. B., Costa, A. J., Jordão Filho, S., Paim, B. B., Pinto, F. R. and Di Mauro, D. C. 2007. *Toxoplasma gondii* in sêmen of experimental infected swine, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, 27: 430-434.

Owen M.R., Tress, A.J.1998. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology*, Cambridge, 116, 299-304.

Pfaff A.W. e Candolf E. 2008. New insights in toxoplasmosis immunology during pregnancy. Perspective for vaccine prevencion. *Parassitologia*, Strasbourg, 50 (1-2): 55-8.

Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H.,1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington.

Roberts CW, Alexander J. 1991. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*, Great Britain, 104, 19-23.

Sachse K. 2004. Review: Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Molecular Biotechnology*, v.26, n 61, 61-79.

Santana L., Costa A., Pieroni J., Lopes W., Santos R., Oliveira G., Mendonça R., Sakamoto C. 2010. Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats, Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 179-182, jul.-set. 2010.

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

Sedlač K.; Literák I., Pavlašek I. e Benač J. 2001 Susceptibility of Common Voles to Experimental Toxoplasmosis, Journal of Wildlife Diseases, Brno, Czech Republic 37(3), pp. 640–642.

Shojaee S.;Rezaie S., Keshavarz H. 2007. Detection of *Toxoplasma gondii* from sera and urine of experimentally mice by PCR. Pakistan Journal of Biological Sciences, Tehran, 1:10(1):193-5.

Sibley L.D., Boothroyd, J.C. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Letters to Nature, Rampshie, 359, 82-85.

Spalding, S. M., Angel, S. O., Amendoeira, M. R. R. 2006. Toxoplasmose. In: Rossetti, M. L; Silva, C. M. D.; Rodrigues, J. J. S. (eds.), Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular (Brasil, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), 102-111.

Vitor, R.W.A.; Pinto, J.B., Chiari, C.A. 1991. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia, 43 (2): 147-54.

Wallace, G.D., 1973. Intermediate and transport hosts in the natural history of *Toxoplasma gondii*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Stanford, 22, 456–464.

Zenner L., Darcy, F., Cesbron-Delauw M. e Capron A. 1993. Rat Model of Congenital Toxoplasmosis: Rate of Transmission of Three *Toxoplasma gondii* Strains to Fetuses and Protective Effect of a Chronic Infection. Infection and Immunity, Lille, France, Vol. 61, No. 1, p. 360-363.

Tabela 1: Frequências de fêmeas positivas na sorologia, PCR e PCR-Nested de tecidos reprodutivos (útero e ovários) e ocorrência de parto e natimortos.

Grupos (Animal)	RIFI		PCR	Nested-PCR	Partos	Natimortos
	IgM	IgG				
GF1 (F1-F10)						
F1	-	-	-	+	+	-
F2	-	-	-	+	+	-
F3	-	-	+	+	+	-
F4	-	-	-	+	+	-
F5	-	-	-	+	-	-
F6	-	-	-	+	+	-
F7	-	-	-	+	+	-
F8	-	-	-	+	+	-
F9	-	-	-	+	+	-
F10	-	-	-	+	+	-
% GRUPO	0%	0%	10%	100%	90%	0%
GF2 (F1-F10)						
F1	-	-	-	-	+	-
F2	-	-	-	+	+	+
F3	-	-	-	+	+	-
F4	-	-	-	+	-	-
F5	-	-	-	+	+	+
F6	-	-	-	+	-	-
F7	-	-	+	+	-	-
F8	-	-	-	+	+	-
F9	-	-	-	+	-	-
F10	-	-	-	+	+	-
% GRUPO	0%	0%	10%	90%	60%	20%
GF3 (F1-F10)						
F1	-	-	+	+	+(*)	+
F2	-	-	-	-	-	-
F3	-	-	+	+	-	-
F4	-	-	-	+	-	-
F5	-	-	-	+	+(*)	+
F6	-	-	-	-	-	-
F7	-	-	-	-	-	-
F8	-	-	-	-	-	-
F9	-	-	+	+	-	-
F10	-	-	-	+	-	-
% GRUPO	0%	0%	30%	60%	20%	20%
GF4 (F1-F10)						
F1	-	-	+	+	-	-
F2	-	-	-	-	-	-
F3	-	-	-	+	-	-
F4	-	-	-	-	-	-
F5	-	-	+	+	-	-
F6	-	-	-	-	-	-
F7	-	-	-	-	+(*)	+
F8	-	-	-	+	+(*)	+
F9	-	-	-	+	-	-
F10	-	-	-	-	-	-
% GRUPO	0%	0%	20%	50%	20%	20%

(*) parto distócico

Tabela 2- PCR e PCR-nested de pool de tecidos (cérebro e vísceras) em amostras de natimortos ou neonatos (n=2).

Grupos de Fêmeas	Amostras prole			
	PCR		PCR-nested	
	P1	P2	P1	P2
GF2				
F2	+	+	+	+
F5	-	-	+	-
GF3				
F1	+	-	+	+
F5	-	+	+	+
GF4				
F8	-	+	-	+
F9	+	+	+	+

P= prole; F=Fêmeas

Veterinary Parasitology

Guide for Authors

An international scientific journal and the Official Organ of the American Association of Veterinary Parasitologists (AAVP), the European Veterinary Parasitology College (EVPC) and the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

Veterinary Parasitology

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor: Dr F.H.M. Borgsteede

Animal Sciences Group, Wageningen UR

Division Infectious Diseases

Laboratory of Parasitic Diseases

P.O. Box 65

8200 AB Lelystad

The Netherlands

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication,

and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System. Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to Veterinary Parasitology who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent Abstract Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside

the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*
Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruyssen, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.
 - c. *For books*
Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.
 - d. *For multi-author books* Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.
6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.
6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ¹⁸O
7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use

by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com.

Requests may also be completed online via the Elsevier homepage

<http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with

permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com. Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

ANEXO

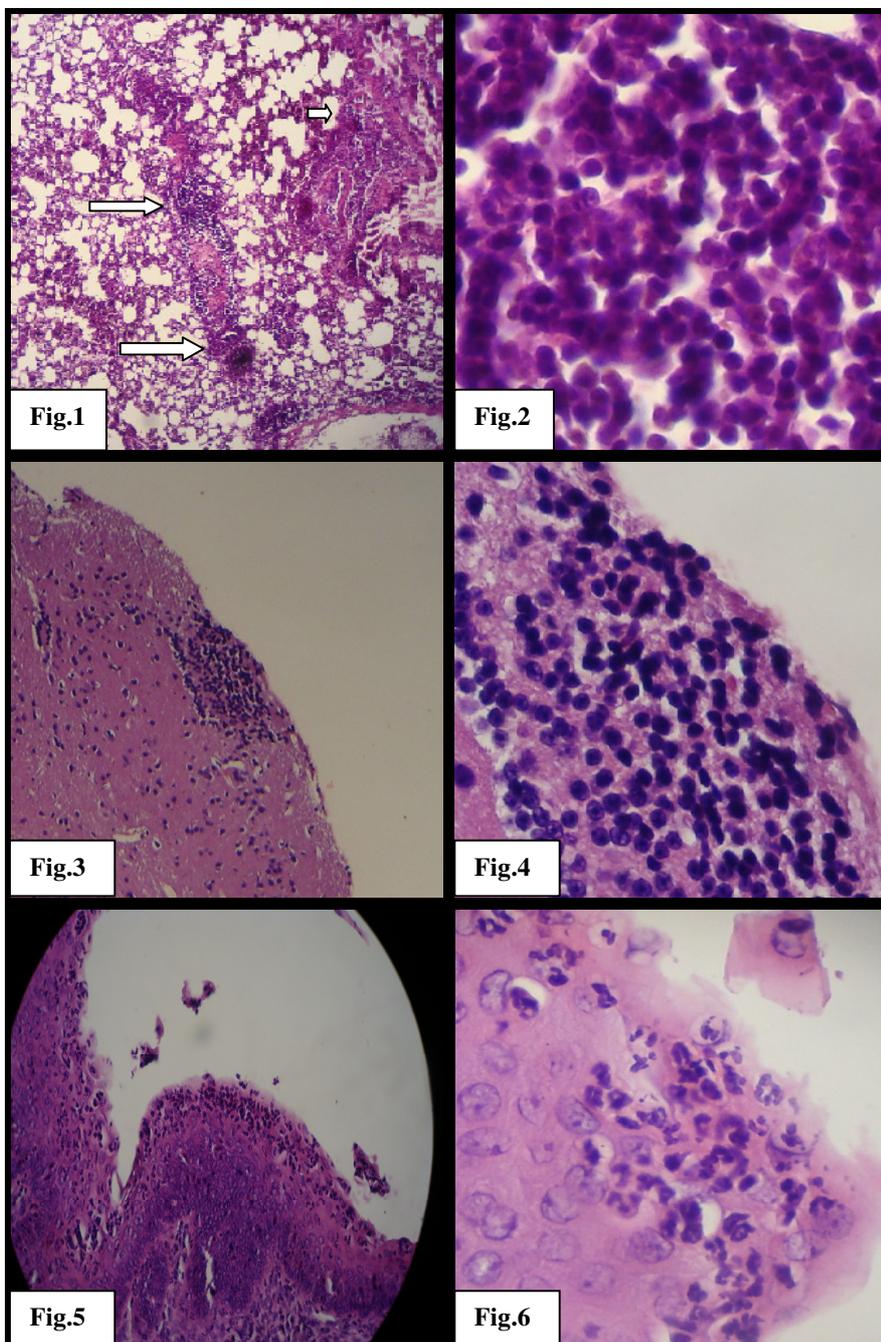


Fig. 1: Pneumonia intersticial mononuclear difusa HE, 40X.

Fig. 2: Detalhe do infiltrado mononuclear em pulmão HE, 100X

Fig. 3: Encéfalo. Foco de infiltrado mononuclear em córtex cerebral. HE, 40 X.

Fig. 4 Detalhe do infiltrado Fig.3 . HE, 100 X.

Fig. 5: Endométrio. Metaplasia do epitélio com presença de infiltrado constituído predominantemente por polimorfonucleares. HE, 40X.

Fig.6: Endométrio. Detalhe da imagem anterior. Notar a presença de polimorfonucleares no epitélio endometrial.

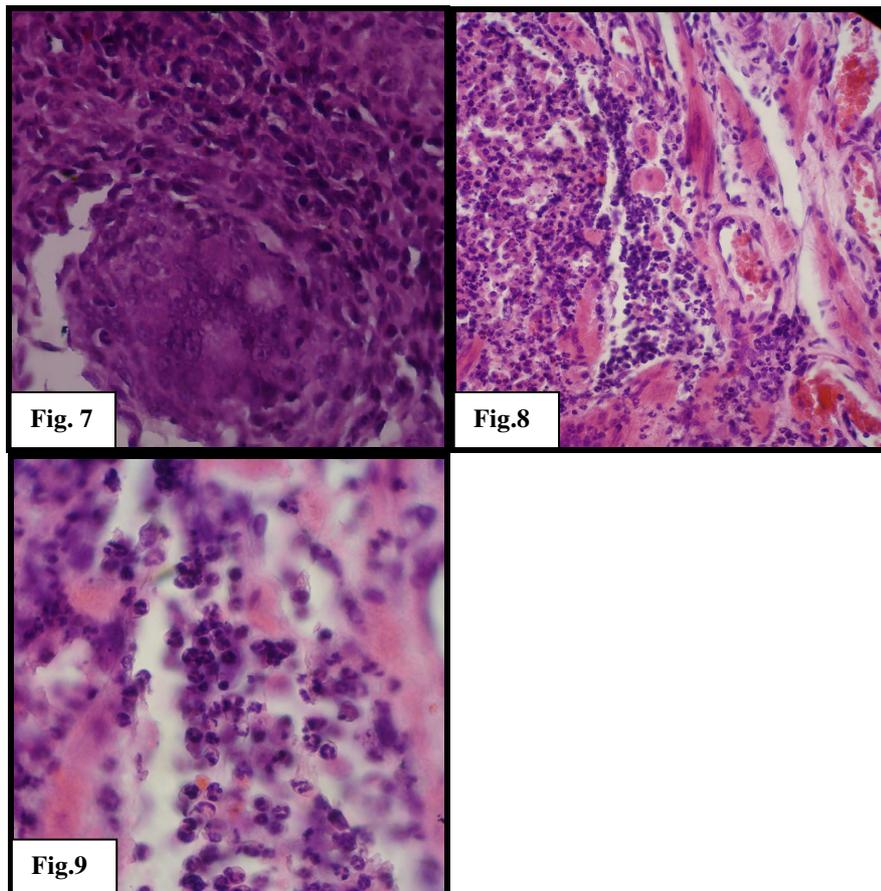


Fig. 7: Foco de necrose em miométrio. HE, 40X.

Fig. 8: Miométrio. Presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear. HE, 40 X.

Fig. 9: Infiltrado inflamatório constituído por polimorfonucleares com predominância de neutrófilos. HE, 100 X.

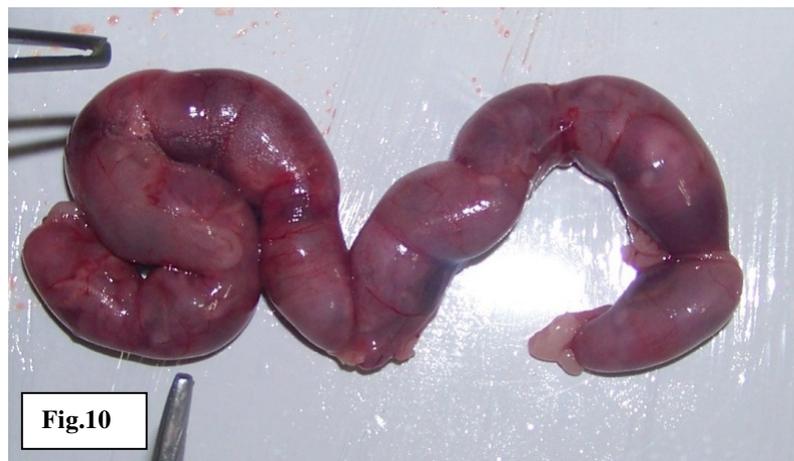


Fig. 10: Útero gravídico com áreas de congestão.

Fig. 11 e 12: Fetos sem uniformidade de tamanhos.

