

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TRANSMISSÃO GALACTOGÊNICA DE *Toxoplasma gondii* NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE RATAS WISTAR

VERUSKA MAIA DA COSTA

BOTUCATU – SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TRANSMISSÃO GALACTOGÊNICA DE *Toxoplasma gondii* NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE RATAS WISTAR

VERUSKA MAIA DA COSTA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone B. Lucheis

Veruska Maia da Costa. Transmissão galactogênica de *Toxoplasma gondii* na infecção experimental de ratas Wistar. Defesa: 28/05/2008

Local: FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu/SP

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Associado Dr. Italmir Teodorico Navarro

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Centro de Ciências Agrárias UEL - Londrina/PR

Profa. Assistente Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani

Membro Titular

Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal

Faculdade de Odontologia - UNESP - Araçatuba/SP

Profa. Titular Lisiane Almeida Martins

Membro Suplente

Departamento Medicina Veterinária

UNIPAR - Umuarama/PR

Prof. Assistente Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Assistente Dr. Paulo Francisco Domingues

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Antônio Costa e Vilany Costa, por serem exemplos de dignidade e fortaleza, pessoas vencedoras cujo apoio foi de fundamental importância para o meu crescimento pessoal e profissional sempre me mostrando a ver os fatos e a vida como realmente são e nunca me deixando desistir. O meu obrigada é muito pequeno diante da grandeza do que fizeram por mim”

Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar e dar força e perseverança em todos os meus dias, e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais;

Aos meus pais, Antônio Costa e Vilany Costa, pessoas mais queridas e especiais que possuo em vida, sempre estiveram ao meu lado, mesmo a distância durante o período da pós-graduação, permitiram que eu pudesse chegar até aqui, acreditando em mim e acima de tudo, pelo amor, paciência, apoio, carinho, atenção e dedicação incansável e principalmente pelos sacrifícios feitos;

Aos meus irmãos Jefferson Costa e Jonatas Costa mesmo pelas diferenças comuns entre irmãos, sempre me apoiaram e incentivaram, amo vocês;

Ao Jonas Brant por todas as vezes que mesmo sem dominar muito bem o assunto, ficava me olhando, ouvindo, dando conselhos, sugestões, colaborando assim, para a realização deste trabalho; pelo grande amor que nos une e que é à base de toda minha força, te agradeço, pela compreensão, pela paciência, pela amizade, e tranquilidade nos momentos difíceis;

Em especial, e com grande carinho e consideração, ao Professor Helio Langoni, pelos ensinamentos transmitidos nesses anos de convivência, principalmente por acreditar no meu potencial e pela confiança que depositou em mim, desde a Residência dando-me oportunidade de trabalhar, contribuindo assim tanto para o meu crescimento profissional como pessoal;

A Cidinha e ao Guilherme, pessoas ótimas, obrigada pela convivência, pelos momentos de alegria e descontração;

A família que ganhei, “Família Beira Serra”, Cris, Dr. Brant, Vó Coraly, Lucas, Filho, Luciene, Ana, Gonzalo, Tomaz, Walderi, Maria, Ademir, Eduardo e Ricardo, que me acolheram, obrigada pelo imenso carinho;

À Walkíria Prado, companheira, amiga, muito obrigada por sua amizade e espero que continue assim, sólida e sincera;

À Nair Lira, amiga que “ganhei” nesta etapa final da dissertação, agradeço por sua amizade e pelos valiosos conselhos;

Aos grandes amigos que fiz em Botucatu, André Peres, Priscila Barbante e Rodrigo Costa, pelos auxílios na pesquisa, grande troca de conhecimentos científicos, convivência alegre e saudável, em especial ao Fábio Shimabukuro pelo apoio direto na realização dessa pesquisa;

Aos amigos Adriana Oliveira e Rodrigo Alfani, pelas conversas e momentos alegres de descontração e incentivo nas horas certas;

Aos colegas de pós-graduação, Ana Carolina Ramalho, Tatiana Salerno, Amanda Siqueira, Simone Mangia, Acácia Elias, Deolinda Carneiro, Claudia Mello, Juliana Giantomassi, Luciana Costa e Patrícia Faccioli, pela ótima convivência, ajuda e troca de conhecimentos;

Aos residentes, Leila Ullmann, Lucilene Camossi, Marta Fernandes, pela ajuda prestada;

Aos bolsistas de Iniciação Científica do CNPq Felipe Gazza e Tatiana Ykeda, pelo auxílio na realização da parte experimental;

Aos professores, Simone Baldini Lucheis, Paulo Francisco Domingues, Marcio Ribeiro Garcia, Jane Megid, Luiz Carlos Souza, José Rafael Modolo, Germano Biondi, Antonio Carlos e Antonio Carlos Paes, pela experiência compartilhada durante a pós-graduação;

Ao Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP, em especial a Profa. Noeme Souza, pela ajuda no diagnóstico citológico;

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Benedito Menozzi, Marcos Vinicius, Joseane Crespilho, Wanderley Forlin, Sergio Fávero, Rodrigo Carrera, Adilson Pardal, Adriana Pavan, Tânia Martins, pela solicitude e boa vontade sempre que precisei;

Aos funcionários da seção de pós-graduação, Denise Garcia, Maria Manuel e José Roberto pelo ótimo atendimento, gentileza, atenção, compreensão e esclarecimentos sempre quando solicitado;

Ao Prof. Doutor Aristeu da Silva, pela imprescindível assistência estatística;

Aos funcionários da biblioteca da Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu/SP, pela colaboração na adequação das referências bibliográficas as normas da ABNT desta dissertação;

À FAPESP pela concessão de bolsa e auxílio pesquisa, fundamental para o referido projeto de pesquisa sob o número 2005/03017-5 e 2006/02860-3 respectivamente;

Ao CNPq pela concessão de auxílio pesquisa, permitindo a concretização deste trabalho, sob o número 471.914/2006-1.

Enfim, a todas as pessoas que anonimamente, fizeram e fazem parte da minha caminhada, que contribuíram ou contribuem para o meu crescimento pessoal, profissional, intelectual e espiritual, e que de uma forma ou de outra, foram importantes para realização deste trabalho. Muito obrigada.

*“Diante de qualquer desafio,
o importante é assumirmos a direção de nossas vidas,
seguindo a nossa intuição e o nosso coração.*

*Devemos aceitar os desafios como algo positivo,
que sempre nos trará crescimento a qualquer tempo.*

*Encare os desafios de frente,
abraçe as oportunidades,
pois a estagnação empobrece o espírito”.*

*Salmos – Espelho da Alma
Salmos, por Nívea Mallia Cittadino*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção (TOX4 e TOX5) de <i>Toxoplasma gondii</i> , em amostras de leite materno e tecidual.	46
Quadro 2. Etapas da amplificação das regiões codificadoras dos oligonucleotídeos utilizados na detecção (TOX4 e TOX5) de <i>Toxoplasma gondii</i>	47
Quadro 3. Referência para os reagentes utilizados na PCR para uma amostra.	112

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Reação de aglutinação em amostras de soro. 1) Controle sabidamente positivo, 2) Amostra testada e positiva, 3) Controle sabidamente negativo. Botucatu, 2008. 39
- Figura 2. Inoculação de taquizoítos via intraperitoneal em camundongos Swiss albinos de 30 dias de idade para produção de antígeno, utilizado na inoculação experimental. Botucatu, 2008. 39
- Figura 3. Cisto de *T. gondii* obtido pelo método de separação de cistos pelo Percoll 25% em tecido cerebral de camundongo infectado com a cepa BTU4. Aumento de 1000x. Botucatu, 2008. 41
- Figura 4. Demonstração da coleta de leite. 1) Preparação do animal anestesiado para coleta de leite; 2) massagem da glândula mamária após a aplicação de ocitocina; 3) pipeta pasteur estéril e descartável para coletar a amostra; 4) leite coletado e armazenado em microtubo. Botucatu, 2008. 44
- Figura 5. Dinâmica dos títulos de anticorpos séricos anti-*T. gondii*, detectados pela RIFI, nas ratas do G1 e G2 infectadas experimentalmente com 10^4 bradizoítos pela via oral com a cepa BTU4. Botucatu, 2008. 52
- Figura 6. Dinâmica dos títulos de anticorpos séricos anti-*Toxoplasma gondii*, detectados pelo método de aglutinação direta, nas ratas do G1 e G2 infectadas experimentalmente com 10^4 bradizoítos pela via oral com a cepa BTU4. Botucatu, 2008. 52
- Figura 7. Dinâmica dos títulos de anticorpos séricos anti-*T. gondii*, detectados pela RIFI e pelo MAD do G1 e G2 infectadas experimentalmente com 10^4 bradizoítos pela via oral com a cepa BTU4. Botucatu, 2008. 53

- Figura 8. Formas sugestivas de taquizoítos em esfregaço de amostra de leite. Coloração pelo método de Giemsa. Aumento 40x. Botucatu, 2008. 56
- Figura 9. Proporção de detecção de formas sugestivas de *T. gondii* no leite das ratas G1 x G2 (esquerda), G1 x G3 (centro), G2 x G3 (direita) infectadas experimentalmente com 10^4 bradizoítos pela via oral com a cepa BTU4. Botucatu, 2008. 58
- Figura 10 Visualização de banda de 529pb, em gel de agarose a 2%. Limiar de detecção da PCR para o gene repetitivo amplificado de segmento de DNA de *T. gondii* para amostras puras e de leite em diferentes concentrações. Amostras de exsudato peritoneal diluídas. (A) Amostras de leite contaminadas por exsudato peritoneal com taquizoítos (B). 1) Padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen®; 2) $1,5 \times 10^4$ taquizoítos/mL; 3) $1,5 \times 10^3$ taquizoítos/mL 4) $1,5 \times 10^2$ taquizoítos/mL; 5) $1,5 \times 10^1$ taquizoítos/mL; 6) $1,5 \times 10^0$ taquizoítos/mL.. Botucatu, 2008. 63
- Figura 11 Visualização de banda de 529pb, em gel de agarose a 2%. Limiar de detecção da PCR para o gene repetitivo amplificado de segmento de DNA de *T. gondii* para amostras puras de exsudato peritoneal rico em taquizoíto e de leite em diferentes concentrações. Amostras de exsudato peritoneal diluídas (A); cérebro (B); pulmão (C) e língua (D). 1) Padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen®; 2) $1,5 \times 10^4$ taquizoítos/mL; 3) $1,5 \times 10^3$ taquizoítos/mL 4) $1,5 \times 10^2$ taquizoítos/mL; 5) $1,5 \times 10^1$ taquizoítos/mL; 6) $1,5 \times 10^0$ taquizoítos/mL.. Botucatu, 2008. 64
- Figura 12. Visualização de banda de 529pb, em gel de agarose a 2%. Limiar de detecção da PCR para o gene repetitivo amplificado de segmento de DNA de *T. gondii* para amostras puras de exsudato peritoneal de rico em taquizoíto e de leite em diferentes concentrações. (A); coração (B); tecido mamário (C) e musculatura esquelética estriada (D). 1) Padrão de peso molecular 100 bp DNA-

Ladder Invitrogen®; 2) $1,5 \times 10^4$ taquizoítos/mL; 3) $1,5 \times 10^3$ taquizoítos/mL. Amostra de tecido hepático Botucatu, 2008. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resultado do exame sorológico pela RIFI a MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , nas fêmeas inoculadas. Botucatu, 2008.	51
Tabela 2.	Resultado do exame sorológico para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , em soros dos filhotes do G1 comparando RIFI x MAD. Botucatu, 2008.	54
Tabela 3.	Resultado do exame sorológico para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , em soros dos filhotes do G3 comparando RIFI x MAD. Botucatu, 2008.	54
Tabela 4.	Resultado do exame sorológico pela RIFI para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , em soros dos filhotes do G1 x G3. Botucatu, 2008.	55
Tabela 5.	Resultado do exame sorológico pela MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T. gondii</i> , em soros dos filhotes G1 x G3. Botucatu, 2008.	55
Tabela 6.	Detecção de formas sugestivas de <i>T. gondii</i> em esfregaços de secreção láctea coletada durante os 15 primeiros dias de lactação. Botucatu, 2008.	57
Tabela 7.	Resultados referentes à sorologia dos camundongos inoculados com <i>pool</i> de tecidos dos animais do G1 e das respectivas ninhadas. Botucatu, 2008.	60
Tabela 8.	Resultados referentes à sorologia dos camundongos inoculados com <i>pool</i> de tecidos dos animais do G2. Botucatu, 2008.	61
Tabela 9.	Resultados referentes à sorologia dos camundongos inoculados com <i>pool</i> de tecidos dos animais do G3 e das respectivas ninhadas. Botucatu, 2008.	62

Tabela 10. Resultado da PCR nas seis amostras de leite coletadas durante os primeiros 15 dias de lactação, nas seis fêmeas de cada grupo. Botucatu, 2008.....	66
Tabela 11. . Resultado da PCR nas oito amostras teciduais coletadas após 21 dias de lactação, nas fêmeas de cada grupo. Botucatu, 2008.....	67
Tabela 12. Resultado da PCR nas sete amostras teciduais coletadas após 21 dias de vida, nos seis filhotes de cada fêmea do G1. Botucatu, 2008.....	68
Tabela 13. Resultado do exame sorológico pela RIFI a MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , dos animais pertencentes ao G1, fêmeas inoculadas via oral com 10^4 bradizoítos da cepa BTU4, cronicadas. Botucatu, 2008.....	100
Tabela 14. Resultado do exame sorológico pela RIFI e MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , dos animais pertencentes ao G2, fêmeas inoculadas via oral com 10^4 bradizoítos da cepa BTU4 cronicadas e imunossuprimidas após o parto Botucatu, 2008.....	101
Tabela 15. Resultado do exame sorológico pela RIFI e MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , dos animais pertencentes ao G3, fêmeas inoculadas via oral com 10^4 bradizoítos da cepa BTU4 após o parto. Botucatu, 2008.....	102
Tabela 16. Resultado do exame sorológico pela RIFI e MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , em soros dos filhotes das ratas do G1, com 21 dias de idade. Botucatu, 2008.....	103
Tabela 17. Resultado do exame sorológico pela RIFI e MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti- <i>T.gondii</i> , em soros dos filhotes com 21 dias de vida das ratas do G3. Botucatu, 2008.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PCR	Reação em cadeia pela Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
MAD	Método de Aglutinação Direta
dpi	Dias pós-inoculação
HIV	Vírus da Imunodeficiência adquirida
aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
SSTF	Solução Salina Tamponada de Fosfatos
g	Gramas
mg/kg/dia	Miligramas por quilograma de peso vivo por dia
mL	Mililitro
µL	Microlitro
x g	Veze a gravidade
2ME	2- Mercaptoetanol
M	Molar
°C	Grau Celsius
mmol	Milimol
µM	Micromolar

SUMÁRIO

SUMÁRIO	xvi
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1. Animais experimentais	34
4.2. Delineamento experimental	34
4.3. Cepas de <i>T. gondii</i>	35
4.3.1. Produção de antígeno para RIFI	35
4.3.2. Preparação de lâminas para RIFI.....	36
4.3.3. Diluição dos soros	36
4.3.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	36
4.3.5. Produção de antígeno para o método de aglutinação direta modificada (MAD)	37
4.3.6. Método de Aglutinação Direta (MAD).....	37
4.3.7. Inoculação dos animais	38
4.4. Infecção experimental	41
4.5. Acasalamento.....	41
4.6. Anestesia e eutanásia dos animais experimentais.....	42
4.7. Redução da ninhada	42
4.8. Coleta das amostras	42
4.8.1. Sangue	42

4.8.2. Leite.....	43
4.8.3. Amostras teciduais.....	44
4.9. Exames realizados.....	45
4.9.1. Sorológico.....	45
4.9.2. Citologia.....	45
4.9.3. Inoculação em camundongos - Bioprova.....	45
4.9.4. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	45
4.9.4.1. Extração e purificação de DNA.....	46
4.9.4.2. Amplificação de DNA.....	46
4.9.4.3. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados na PCR.....	47
4.9.4.4. Limiar de detecção de <i>T. gondii</i> para amostras de leite e tecidos.....	47
4.9.4.5. Controles.....	48
4.10. Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Animais experimentais.....	49
5.2. Exames sorológicos.....	50
5.3. Citologia.....	56
5.4. Inoculação em camundongos - Bioprova.....	59
5.5. PCR.....	63
5.5.1. Limiar de detecção de <i>T. gondii</i> para amostras de leite e tecidos.....	63
5.5.2. Detecção de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de leite e teciduais.....	65
6. Discussão.....	69

6.1. Animais experimentais	69
6.2. Exames Realizados	72
6.2.1. Provas Sorológicas.....	72
6.2.2. Citologia.....	77
6.2.3. Inoculação em camundongos - Bioprova	78
6.2.4. PCR.....	80
7. CONCLUSÃO.....	83
8. REFERÊNCIAS	84
9. ANEXOS.....	99
9.1. Anexo A – Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal	99
9.2. Anexo B - Tabelas e Figuras	100
9.3. Anexo C - Fórmulas e soluções.....	105
9.3.1. Para reação de imunofluorescência indireta	105
9.3.2. Para o método de aglutinação direta modificada (MAD).....	105
9.3.3. Para infecção experimental	106
9.3.4. Para inoculação em camundongos (Bioprova).....	107
9.3.5. Para citologia por <i>imprints</i>	107
9.3.6. PCR.....	108
9.4. Anexo D - Protocolo de extração e purificação pelo GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences) - método direto, segundo manual do fabricante, com modificações.....	110
9.5. Anexo E - Protocolo de extração e purificação pelo Illustra Blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare/Life Sciences), segundo manual do fabricante.....	111

9.6. Anexo F - Quadro 3. Referência para os reagentes utilizados da PCR para uma amostra	112
9.7. Anexo G - Materiais utilizados	113
10. Artigo Científico.....	1

COSTA, V.M. **Transmissão galactogênica de *Toxoplasma gondii* na infecção experimental de ratas Wistar**. Botucatu, 2008. 98p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo.

RESUMO

A toxoplasmose é similar em humanos e em ratos, sendo estes, o modelo experimental, mais utilizado para o estudo da doença. Há poucos relatos da transmissão desta enfermidade pelo leite materno, e desta forma o objetivo do presente estudo foi pesquisar a presença de *Toxoplasma gondii* no leite de ratas experimentalmente infectadas e a transmissão galactogênica. Utilizaram-se ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), divididas em três grupos: G1, G2 e G3, contendo seis fêmeas cada um. Foram inoculadas via oral com 10^4 bradizoítos da cepa BTU4, genótipo I, isolada de cão com cinomose. As ratas do G1 e G2 foram infectadas 60 dias antes do acasalamento e as do G3 logo após o parto. Os animais do G2 foram submetidos à imunossupressão pós-parição. Para a detecção do parasito no leite utilizou-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e para verificar a transmissão para os filhotes pesquisou-se nestes anticorpos anti-*T. gondii* pela imunofluorescência indireta (RIFI) e método de aglutinação direta (MAD), e a bioprova pela inoculação de camundongos com *pool* de tecidos (cerebral, pulmonar, hepático, cardíaco, muscular esquelético, língua e diafragma) de cada ninhada, bem como pela PCR nestes tecidos individualmente. A PCR foi positiva em três amostras de leite, duas provenientes da rata 1 do G1, e uma da rata 3 do G3. Os filhotes de todas as ratas do G1 soroconverteram, mas foram negativos na bioprova. Filhotes das ratas 1 e 3 do G3 soroconverteram, e a bioprova foi positiva. Amostras de fígado, musculatura esquelética e pulmão de filhotes do G1 foram positivas na PCR. Desta forma conclui-se que ocorreu a transmissão do *T. gondii* pelo leite, sugerindo-se novos estudos em lactentes, considerando-se a magnitude da doença em crianças e recém-nascidos.

Palavras-chave: Infecção experimental, PCR, Ratas, *Toxoplasma gondii*, Transmissão galactogênica

COSTA, V.M. **Lactational transmission of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected wistar female rats.** Botucatu, 2008. 98p. Dissertation (Master) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Campus of Botucatu, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is similar in humans and rats, and the latter constitute the most used experimental model to study this disease. Few reports on toxoplasmosis transmission through maternal milk are available in literature; thus, the aim of the present study was to investigate whether *Toxoplasma gondii* is present in and transmitted through the milk of experimentally infected rats. Wistar (*Rattus norvegicus*) female rats were divided into three groups: G1, G2 and G3, with six animals each. They were orally inoculated with 10^4 bradyzoites of BTU4 strain, genotype I, isolated from a dog with distemper. G1 and G2 rats were infected 60 days before mating and those of G3, soon after the parturition. G2 animals were subjected immunosuppression just after parturition. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the parasite in the milk. To verify the parasite transmission to the offspring, these anti-*T. gondii* antibodies were investigated through indirect immunofluorescence assay (IFA) and direct agglutination test (DAT). Bioassay consisted of inoculating mice with a pool of tissues (brain, lungs, liver, heart, skeletal muscle, tongue and diaphragm) from each litter, as well as PCR in these tissues individually. PCR was positive in three milk samples, two from rat 1 (G1) and one from rat 3 (G3). The pups of all G1 rats seroconverted but were negative in the bioassay. The pups of rats 1 and 3 (G3) seroconverted and their bioassay was positive. Liver, skeletal muscle and lung samples were PCR-positive in G1 pups. Thus, we can conclude that *T. gondii* was transmitted through milk, suggesting the need of new studies in breast-feeding mothers as this disease is highly severe in children and newborns.

Keywords: Experimental infection; PCR; Rats; *Toxoplasma gondii*; Lactational transmission

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular obrigatório, de distribuição cosmopolita, constituindo-se em uma importante zoonose (ACHA e SZYFRES, 2003), que infecta uma ampla variedade de animais suscetíveis.

O gato é o hospedeiro definitivo, enquanto que o homem, outros mamíferos e as aves são os hospedeiros intermediários. Apresenta considerável relevância quanto aos aspectos de produção animal, já que pode causar aborto em diferentes espécies animais de interesse zootécnico (TENTER, 1998), bem como para a saúde pública, pois trata-se de uma enfermidade oportunista em pacientes HIV positivos ou que apresentem imunodeficiência severa, e é ainda, causa importante de abortos ou de enfermidade congênita na primoinfecção materna durante a gravidez (DEROUIN et al., 1995).

Normalmente o *T. gondii* parasita o hospedeiro sem pródromos, mas leva à formação de cistos teciduais que podem persistir durante toda a sua vida. Os maiores problemas clínicos da toxoplasmose referem-se à primoinfecção durante a gestação, podendo causar abortamento e mortalidade neonatal em ovinos, caprinos e suínos resultando em grandes perdas econômicas. Outro aspecto importante é a reativação de infecções latentes em imunossuprimidos, com o desenvolvimento de quadros severos, às vezes fatais (DUBEY e BEATTIE, 1988).

A infecção se dá pelo consumo de carne crua ou mal cozida contendo a forma cística do parasito e de hortifrutigranjeiros contaminados com oocistos, além do contato com o mesmo a partir do meio ambiente. Outra forma possível de infecção é a ingestão de leite *in natura*, a partir do leite de cabras infectadas (CHIARI e NEVES, 1984). Há, entretanto, poucos estudos que confirmem a infectividade pelo leite materno para o filho.

Entre 15 e 85% da população humana adulta é cronicamente infectada pelo *T.gondii*, dependendo da localização geográfica (DUBEY e BEATTIE, 1988). Estima-se que mundialmente, 1 a 2 bilhões de pessoas estejam infectadas pelo *T.gondii*, variando entre 20 a 83% da população (KAWAZOE, 2000), e segundo Sawadogo et al. (2005), 60% dos casos são assintomáticos.

Para saúde pública a enfermidade apresenta grande importância por causar abortos na transmissão congênita, infecção fetal grave, comprometimento neurológicos e oculares em crianças, como retardo mental e cegueira, além de acometer gravemente pacientes imunocomprometidos, principalmente os HIV positivos (TENTER et al., 2000).

Considerando a importância da infecção toxoplásmica na população humana, a qual além de acarretar prejuízos e morte, gera altos custos com serviços médicos, hospitalização de recém-nascidos ou de crianças, exames laboratoriais, medicamentos, custos com educação especial desde a infância, até o indivíduo adulto. O objetivo do presente estudo foi avaliar a infecção materno-neonatal na infecção toxoplásmica pela pesquisa do agente no leite de ratas infectadas experimentalmente, observando-se a possibilidade da transmissão galactogênica à ninhada procurando-se estabelecer aspectos da biologia do parasito e da epidemiologia da enfermidade, como nos casos de reativação da infecção crônica frente à imunossupressão, bem como da primoinfecção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A toxoplasmose tem como agente etiológico o *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiorida e Família Sarcocystidae, sendo a única espécie do gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 1994).

As primeiras descrições do *Toxoplasma gondii* ocorreram quase que simultaneamente em diferentes partes do mundo em 1908. No Brasil, Splendore (1908) descreveu o parasito em coelhos e Nicolle e Manceaux (1908), em Tunis na África do Norte, descreveram o parasito em tecidos de um roedor africano, o *Ctenodactylus gondi*. A denominação do gênero deriva do grego "toxon", que significa arco e "plasma", que significa forma, e refere-se a um estágio do ciclo evolutivo do parasito

A primeira descrição da doença humana foi descrita por Jankü (1923), caracterizada pela presença do parasito da retina de uma criança falecida aos 11 meses de idade com hidrocefalia e cegueira. A doença congênita foi descrita por Wolf e Cowen (1937), onde relataram o óbito de um lactente com encefalite granulomatosa. Os mesmos pesquisadores realizaram a primeira transmissão experimental da toxoplasmose humana para animais, demonstrando que o agente infeccioso produzia doença intra-uterina.

A descoberta do *T. gondii* como causa de doença adquirida no adulto é creditada a Pinkerton e Weinman (1940), que descreveram um caso de doença generalizada fatal, em um jovem. Entretanto, a freqüência da infecção humana somente foi reconhecida a partir de 1948, com Sabin e Feldman a partir da introdução do teste do corante desenvolvido por eles, permitindo a realização de inúmeros estudos, que evidenciaram os aspectos clínicos e epidemiológicos da toxoplasmose e demonstraram a alta prevalência da enfermidade (SABIN e FELDMAN, 1948). Hutchinson et al. (1968), foi o primeiro a relatar o ciclo evolutivo do parasito no gato. Frenkel (1973), descreveram a fase sexuada do *T. gondii* no intestino delgado do gato

doméstico, produzindo oocistos típicos dos coccídeos nas fezes, esclarecendo a natureza desse protozoário

O parasito apresenta três estágios em seu ciclo evolutivo: os taquizoítos; os bradizoítos presentes em cistos teciduais e esporozoítos presentes em oocistos esporulados. Estas formas são infectantes para hospedeiros intermediários e definitivos, que podem adquirir a infecção pela ingestão de oocistos em alimentos contaminados por fezes de felídeos, ou de cistos teciduais presentes na carne crua ou mal cozida de hospedeiros intermediários, verticalmente pela transmissão transplacentária (TENTER, 1998), ou ainda, pela ingestão de taquizoítos que podem estar presentes em leite não pasteurizado de caprinos infectados (TENTER, 1999) e nos casos de transplante de órgãos e transfusões sanguíneas (FRENKEL, 2000).

A enfermidade pode ser dividida em duas fases: a aguda, onde o parasito se dissemina pelos tecidos do hospedeiro, e a fase crônica que se caracteriza pela presença de cistos no cérebro e na musculatura (FRENKEL, 1988). O taquizoíto é encontrado durante a fase aguda da infecção, possui capacidade de multiplicação rápida dentro de células do sistema fagocítico mononuclear bem como células hepáticas, pulmonares, nervosas, submucosa e musculares. Na fase crônica, têm-se os bradizoítos, forma de multiplicação lenta do parasito, encontrados dentro de cistos, localizados predominantemente no sistema nervoso central (SNC), globo ocular, bem como nos músculos esquelético e cardíaco (DUBEY, 1994).

Segundo Sparkes (1998), os felídeos são o ponto-chave na epidemiologia da toxoplasmose, por serem os hospedeiros da forma sexuada do parasito e, portanto, denominados definitivos. Eliminam os oocistos de *T.gondii* pelas fezes, que são vias de transmissão para os outros animais que desempenham o papel de hospedeiros intermediários. Nestes animais, mantêm apenas a fase assexuada, com proliferação de formas císticas nos órgãos.

Com o advento da resposta imune, desenvolvem-se os cistos teciduais, como forma de defesa do agente contra os anticorpos. Estes permanecem viáveis e são infectantes para os gatos, bem como para outros hospedeiros intermediários onívoros (DUBEY, 1994). Quando o sistema imune não controla a infecção, os taquizoítos podem causar toxoplasmose generalizada, que é fatal (FRENKEL, 1988). Desta maneira, o desenvolvimento da resposta imune celular e a resistência aos taquizoítos determinam a sobrevivência do hospedeiro e do próprio parasito, que sob a pressão do sistema imunológico modula-se em bradizoítos e pode persistir encistado durante longo período, principalmente na musculatura e tecido nervoso (DENKERS e GAZZINELLI, 1998). Arias et al. (1994) descreveram que formas viáveis do *T. gondii* são isoladas de uma grande variedade de carnes, e estudos sorológicos têm evidenciado uma ampla distribuição da infecção, entre os animais de interesse zootécnico.

É uma das infecções oportunistas mais frequentes em pessoas imunodeficientes. No geral 3-20% das pessoas infectadas pelo vírus HIV, morrem devido à toxoplasmose (DUBEY, 1994). O *T. gondii* é responsável por uma variedade de síndromes clínicas, sendo a mais comum, a encefalite (KASPER e BUZONI-GATEL, 1998), que resulta da reativação de infecção crônica ou de infecções primárias que também ocorrem nestes indivíduos (FERREIRA, 2000). No estado de São Paulo, em 1998, a aids foi à causa de 4619 mortes, sendo que a toxoplasmose estava associada em 12,2%, sendo a sexta causa de óbitos nestes pacientes (SANTO et al., 2000).

O primeiro relato de surto de toxoplasmose no Brasil foi feito por Magaldi et al. (1967), onde de 81 indivíduos que viviam em um seminário em Bragança Paulista-SP, 30 apresentaram a doença. Em virtude do pouco conhecimento sobre a sua epidemiologia naquela época, os autores chegaram ao fim da investigação sem comprovações e conclusões a respeito das fontes de infecção ou das vias de transmissão.

O maior surto de toxoplasmose do mundo ocorreu no município de Santa Isabel do Ivaí-PR, Brasil, entre novembro de 2001 e janeiro de 2002, onde 462 indivíduos apresentaram-se sororreagentes para toxoplasmose

(anticorpos IgM positivo). Em estudo epidemiológico com 156 indivíduos que apresentavam sintomas da doença, como cefaléia, febre, cansaço, fraqueza, mialgia, adenomegalia e outros. Sete eram gestantes e seis delas tiveram seus filhos infectados, ocorrendo um caso de anomalia congênita grave e um de aborto espontâneo. A investigação concluiu que a fonte de contaminação foi um dos reservatórios de água da cidade contaminado por fezes de gato contendo oocistos de *T.gondii* (MOURA et al., 2006).

A infecção pelo *T. gondii* atinge todas as regiões do país, principalmente a região Sul, onde há relatos de alta incidência, na forma ocular, com relatos inclusive de casos entre irmãos. Provavelmente a toxoplasmose no Sul está associada a uma população de origem alemã e italiana que possui o hábito de ingerir carne suína mal cozida (FRENKEL, 2000). Recentemente, estudos realizados nesta região, registraram prevalências variando de 60 a 74,5% em Porto Alegre-RS no ano de 2003 e de 83,0% na zona rural do estado do Paraná-PR em 1999 (KAWAZOE, 2000).

Diversos inquéritos sorológicos demonstram que a soroprevalência da toxoplasmose varia de 50 a 80% na população adulta saudável (GUIMARÃES et al., 1993). Rey e Ramalho (1999), realizaram inquérito sorológico em grupos populacionais de Fortaleza, pelo teste imunoenzimático, e encontraram anticorpos IgG anti-*T.gondii* em 529 (53,1%) de um total de 997 indivíduos, e em 133 (71,5%) das 185 gestantes avaliadas. No período de 1996 a 1998 em Londrina-PR, Reiche et al. (2000), analisaram 1559 amostras de soros pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e encontraram 1044 (67%) gestantes com IgG anti-*Toxoplasma gondii*. Neste mesmo período, Cantos et al. (2000) detectaram anticorpos anti-*Toxoplasma* pela RIFI em 1255 (41,91%) dos pacientes atendidos na Universidade Federal de Santa Catarina, de um total de 2994, sendo que 26 (0,87%) apresentavam IgM, demonstrando que a prevalência da toxoplasmose é alta.

A toxoplasmose congênita é considerada uma importante causa mundial de mortalidade e morbidade infantil. Nos EUA, estima-se que a cada ano nasçam cerca de 3.000 crianças com toxoplasmose congênita, e o custo anual associado aos cuidados delas são de US\$ 31 a 40 milhões

(DUBEY, 1994). No Brasil, anualmente nascem cerca de 60000 crianças com a doença, sendo, portanto, de alta magnitude, podendo resultar em abortos, partos prematuros, natimortos e casos de malformação. A gravidade é inversamente proporcional à idade gestacional, e à facilidade de transmissão (MACÊDO, 1994). A transmissão ao feto, se dá principalmente durante a fase inicial da infecção, ou raramente, como resultado de recrudescência da infecção crônica materna, durante a gravidez (DESMONTS et al., 1990).

A incidência e a prevalência da infecção pré-natal por *T. gondii* variam em diferentes países, sendo difícil comparar estes dados na infecção congênita entre populações distintas, devido aos variados métodos sorológicos utilizados, bem como, diferenças de exposição às fontes de infecção (DESMONTS et al., 1990; TENTER et al., 2000). Estimativas recentes, baseadas em estudos sorológicos, sugerem incidências de infecção materna primária, durante a gestação, em diferentes populações na Europa, Ásia, Austrália e América, variando de um a 310 por 10000 gestações (TENTER, et al., 2000). O risco de se adquirir a toxoplasmose durante a gestação, correlaciona-se com a sua prevalência na comunidade, com o número de fontes de infecção e com o número de mulheres grávidas na comunidade com sorologia negativa para essa zoonose (FRENKEL, 2000). A cidade de São Paulo apresenta 67% de gestantes sororeagentes e uma incidência da infecção congênita de 16 neonatos por 1000 nascidos vivos (GUIMARÃES et al., 1993).

Quanto à infecção materno-fetal, um estudo prospectivo realizado por Camargo Neto et al. (2000), demonstrou que das 140914 amostras de soro provenientes de todas as regiões do Brasil, 47 eram de casos de toxoplasmose congênita, ou seja, uma prevalência de um caso em cada 3000 nascimentos. Já no município de Campos dos Goytacases-RJ, a incidência de toxoplasmose congênita foi de cinco casos entre os 2550 bebês avaliados (PETERSEN et al., 2001).

Admite-se que raramente uma infecção materna adquirida antes da gravidez possa ser transmitida ao feto, a não ser que a placenta seja colonizada em função de uma recorrência parasitêmica e a imunidade materna seja insuficiente para reprimir a proliferação do parasito (DESMONTS et al.,

1990). Os riscos de infecção intra-uterina, da manifestação da toxoplasmose congênita e a gravidade da doença dependem do período de gestação no qual a infecção ocorre, assim como, da competência imunológica da mãe durante a parasitemia, da carga parasitária e virulência dos parasitos transmitidos ao feto (TENTER et al., 2000).

Em relação à infecção materno-neonatal há poucos estudos, embora alguns trabalhos revelem a presença de taquizoítos no leite de várias espécies como ovino, caprino, bovino e de camundongos experimentalmente infectados (PETTERSEN, 1984; TENTER et al., 2000).

O leite é considerado importante veículo na transmissão da toxoplasmose ao homem (SAARI e RAISANEN, 1974; SOGANDARES-BERNAL et al., 1975). Trabalhos experimentais demonstram que o leite de animais infectados contém taquizoítos, possibilitando a transmissão para a prole (SANGER e COLE, 1955). Riemann et al. (1975) relatou um caso de infecção pelo *T. gondii* em crianças, onde suspeitou-se do contágio pela ingestão de leite de cabras não pasteurizado, embora argumente-se que o suco gástrico inative rapidamente os taquizoítos. Dubey (1998a) discorda do argumento, pois demonstrou a infecção em camundongos e gatos infectados pela via oral com taquizoítos, supondo assim que ocorra a infecção pela ingestão de leite contendo a forma parasitária.

Bonametti et al. (1997) descreveram a transmissão do *T. gondii* em uma mãe que adquiriu a primoinfecção, pela ingestão de carne ovina crua contaminada por cistos, e possivelmente transmitiu o parasito ao recém-nascidos pela amamentação.

Os trabalhos com isolamento de parasitos viáveis de tecidos comestíveis, bem como do leite caprino (CHIARI e NEVES, 1984) revelam a importância da toxoplasmose animal, decorrente do fato dos animais infectados servirem como fontes direta ou indireta, de infecção para o homem.

A demonstração da ocorrência da toxoplasmose em humanos, associada à ingestão de leite de cabras *in natura*, comprovadamente infectadas, torna esses animais importante fonte de infecção, principalmente

pelo fato dos caprinos não serem submetidos normalmente a controle sanitário da toxoplasmose (CHIARI et al., 1987; SKINNER et al., 1990).

Há trabalhos experimentais relatando que camundongas lactantes infectadas, eliminam o *T. gondii* no leite (PETTERSEN, 1984). Vários aspectos dos mecanismos responsáveis pela infecção toxoplásmica são elucidados a partir de modelos experimentais (HUTCHISON et al., 1982, SIMS et al., 1988) e o rato é o animal mais empregado nestes estudos (GAZZINELLI et al., 1992).

De acordo com Dubey e Beattie (1988), a similaridade da suscetibilidade e patogenia em humanos e animais, sugere que a enfermidade pode ser comparável em muitos aspectos. O rato é uma das espécies mais resistentes ao *T. gondii*, sendo a infecção nestes animais similar à nos humanos adultos (DUBEY, 1998). Dentre os modelos animais, a rata é que mais se assemelha a mulher, particularmente em relação ao sistema endócrino e a morfologia de ductos e alvéolos mamários (SOUZA, 1970; RUSSO e RUSSO 1987). A lactação é indispensável para o crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos (SILVA e VASCONCELLOS, 1988), que começam a mamar depois de 15 a 29 minutos do nascimento. Também em relação à placenta é muito semelhante histologicamente a da mulher, sendo ambas do tipo hemocorial, com menor número de camadas de tecido interpostas entre a circulação fetal e a materna (LOKE, 1982).

O *T.gondii* possui três linhagens clonais predominantes, designadas como tipo I, II e III, ocorrendo globalmente nos animais e no homem (DARDÉ et al., 1992). As linhagens são correlacionadas com a virulência em camundongos. As cepas de *T. gondii* se dividem em cepas avirulentas e virulentas para estes animais. As cepas virulentas se multiplicam rapidamente no hospedeiro e causam a infecção aguda, enquanto as avirulentas formam cistos levando a uma infecção crônica (JOHNSON, 1997).

A freqüência dos diferentes genótipos em animais pode ser considerada conflitante. Segundo o estudo de Howe e Sibley (1995), a freqüência das cepas tipo III é maior em animais do que em casos humanos,

devendo-se considerar que, em geral, as amostras de *T.gondii* provenientes de humanos causam doença clínica, enquanto a maioria daquelas provenientes de animais representam infecções crônicas e subclínicas. As cepas tipo II levam a infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos, enquanto as cepas do tipo I são extremamente virulentas para camundongos, causando níveis significativos de parasitemia, que pode aumentar o risco da transmissão transplacentária ou severidade de infecção nos fetos em desenvolvimento.

Apesar da dificuldade de se comparar estudos de grupos de pesquisas distintos, pelo uso de diferentes cepas do parasito, linhagens e protocolos de infecção, os experimentos consistem no desafio da mãe não infectada durante a prenhez, e avaliação da transmissão aos fetos (INNES, 1997).

Em animais experimentais infectados a presença de *T. gondii* pode ser estudada também pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). A técnica de PCR para a detecção de *T.gondii* foi desenvolvida por Burg et al. (1989). Desde então diversos autores a utilizam para a detecção de DNA toxoplásmico em vários espécimes biológicos, tais como humor aquoso, coração, cérebro, placenta, fígado, líquido cerebrospinal, fluido broncoalveolar, líquido amniótico e sangue (PAUGAM et al., 1995; MORGAN, 2000). A maioria dos estudos utilizam a amplificação dos genes B1 (PCR-B1) e SAG-1 (PCR-SAG-1) do *T. gondii* (DA SILVA e LANGONI, 2001).

As técnicas de PCR baseadas na detecção dos genes SAG-1, que codifica a principal proteína de membrana de taquizoítos e B1, de função desconhecida, têm sensibilidade limitada pelo baixo número de cópias das seqüências alvo, já que o gene B1 repete-se 35 vezes e o SAG-1 uma vez. A PCR de DNA ribossomal tem sido investigada, pois esta seqüência repete-se aproximadamente 110 vezes no parasito (ELLIS, 1998), bem como, uma seqüência com 200 a 300 cópias no genoma nuclear do *T. gondii*, descrita por Homan et al. (2000).

A literatura mostra que estudos sobre a infecção congênita empregam principalmente a PCR-B1 em amostras de líquido amniótico, sangue fetal ou placenta e que esta técnica apresenta maior sensibilidade que outros métodos de diagnóstico, variando de 61 a 90% (PELLOUX et al., 1996; JENUM et al., 1998).

A detecção do parasito pela PCR em animais experimentalmente infectados, visando avaliar a parasitemia foi efetuada por alguns autores, entretanto sua detecção depende também da cepa de *T. gondii*, via de inoculação, estágio de desenvolvimento e carga parasitária inoculada, bem como do hospedeiro (HAFID, 2001).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Verificar presença de *T.gondii* no leite e a transmissão galactogênica a partir da infecção experimental em ratas Wistar.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar a soroconversão para *T. gondii* pesquisando IgG nas ratas Wistar experimentalmente infetadas, e de seus respectivos filhotes;
2. Avaliar a infecção toxoplásmica em ratas cronicadas, cronicadas e imunodeprimidas pós-parto, e primoinfectadas pós-parto, e nas respectivas crias;
3. Utilizar protocolo de imunossupressão em ratas Wistar infectadas cronicamente pelo *T.gondii* no período de lactação para avaliar a recrudescência da enfermidade e infecção nos respectivos filhotes;
4. Verificar a presença do parasito nas ratas experimentalmente infectadas e, em seus respectivos filhotes a partir de amostras de tecidos cerebral, hepático, pulmonar, cardíaco, muscular esquelético, língua, diafragma e tecido mamário apenas nas ratas mães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram realizados no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO), Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (DHVSP/FMVZ/UNESP), campus de Botucatu/SP.

4.1. Animais experimentais

Para o experimento foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar albinos, machos e fêmeas, com idade de 30 dias com aproximadamente 60g. E para a obtenção de cistos teciduais de *T. gondii*, utilizou-se camundongos Swiss, albinos, de 30 dias de idade, com aproximadamente 20g, ambos gentilmente cedidos pelo Biotério Central, UNESP, campus de Botucatu/SP, e mantidos no Infectório do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, NUPEZO, DHVSP/FMVZ/UNESP, campus de Botucatu/SP.

4.2. Delineamento experimental

Foram utilizados três grupos experimentais, G1, G2 e G3 com seis ratas fêmeas em cada grupo. As fêmeas foram inoculadas via oral com auxílio de gavagem com 10^4 bradizoítos da cepa BTU4. As ratas do G1 e G2 foram infectadas 60 dias antes do acasalamento e as ratas do G3 logo após o parto. Os animais do G2 foram submetidos à imunossupressão logo após-parição utilizando dexametasona na dose de 2,5mg/Kg/dia, durante 15 dias, segundo o protocolo de Djurkovic-Djakovic e Milenkovic (2001) com adaptações para via subcutânea.

Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno 41 x 34 x 16 cm, piso coberto com maravalha autoclavada, com ração comercial e água filtrada por osmose reserva (Quimis[®]) *ad libitum*. Previamente à inoculação, todos os animais ficaram em observação por um período de adaptação mínimo de 15 dias no infectório do NUPEZO, e submetidos à sorologia para toxoplasmose, utilizando-se a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), segundo Camargo (1964), e também o método de aglutinação direta (MAD) de acordo com Desmonts e Remington (1980), tendo ambas como ponto de corte o título 16. Frente ao resultado negativo, as ratas do G1 e G2 foram inoculadas e mantidas em observação durante 60 dias, a partir da infecção, efetuando-se a coleta quinzenal de sangue, para a obtenção de soro para realização da RIFI e da MAD. Ao final do período de observação foram acasaladas juntamente com o G3.

Foi colhido o leite das mães durante os primeiros 15 dias de lactação para posterior análise das amostras pelo Giemsa e PCR. Após 21 dias, todos os animais foram eutanasiados, ratas fêmeas e filhotes, coletando-se os órgãos para avaliação da presença do parasito e da infecção galactogênica, pela inoculação de camundongos (bioprova) e PCR.

4.3. Cepas de *T. gondii*

4.3.1. Produção de antígeno para RIFI

Utilizou-se a cepa RH de *T. gondii*, isolada por Sabin em 1939 de uma criança nos Estados Unidos (SABIN, 1941), pertencente ao genótipo I e mantida por inoculação intraperitoneal semanalmente de camundongos Swiss albinos de 30 dias com 1mL de exsudato peritoneal proveniente de camundongos previamente infectados pela via intraperitoneal por *T. gondii*. Após o período de incubação, os camundongos foram eutanasiados em câmara de saturação de vapor de isofluorano, obtendo-se o exsudato peritoneal. Este exsudato, rico em taquizoítos, foi homogeneizado volume/volume em solução de formalina a 2%, obtendo-se uma suspensão a 1%, e incubada a 37°C por 30 minutos, agitando-se suavemente por inversão

dos tubos, a cada 10 minutos, com posterior centrifugação a 1600 x g por 5 minutos. Após, desprezar-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento em 2mL de solução salina tamponada de fosfatos (SSTF) pH 7.2, centrifugando-se, como anteriormente. Este procedimento foi repetido por duas a três vezes até a obtenção de 20 a 30 parasitos/campo, utilizando-se microscópio com aumento de 40 vezes para a leitura, para examinar 50µL da suspensão final, entre lâmina e lamínula.

4.3.2. Preparação de lâminas para RIFI

Para fixação do antígeno em lâminas utilizadas na prova sorológica, pipetou-se 10µL da suspensão antigênica nas delimitações de lâminas adequadas para esta finalidade. Removeu-se o excesso, restando apenas uma fina película, que posteriormente foi secada à temperatura ambiente. As lâminas assim preparadas foram mantidas em caixas apropriadas, em freezer a -20°C, até o momento de sua utilização.

4.3.3. Diluição dos soros

Em microplacas distribuiu-se 150µL de SSTF pH 7.2 em cavidades de acordo com o número de amostras a serem testadas. Adicionou-se 10µL do soro a ser testado na primeira cavidade na proporção de 1:16. Transferiu-se 50µL do soro diluído da primeira cavidade para a segunda, homogeneizando-se, repetindo-se esta operação até a quinta cavidade, desprezando-se 50µL da última cavidade (diluições 1:64, 1:256, 1:1024, 1:4096). O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra de soro sabidamente positiva (controle positivo) e outra sabidamente negativa (controle negativo).

4.3.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Na lâmina fixada com o antígeno, distribuiu-se 10µL de cada diluição do soro nos orifícios de acordo com protocolo previamente determinado. Incubaram-se as lâminas à 37°C em câmara úmida por 30 minutos, em seguida foram lavadas duas vezes com SSTF pH 7.2, deixando-as em imersão por 10 minutos cada lavagem. A seguir foram secadas e coradas.

Procedeu-se a diluição do conjugado anti-IgG rat-FITC (Bethyl[®]), em solução de azul de Evans a 20mg% diluída em SSTF pH 7.2 na proporção 1:5. Esta solução preparada com o conjugado diluído em solução de azul de Evans foi distribuída em todos os orifícios da lâmina tratada com o soro, colocando 10 μ L da solução. Novamente a lâmina foi incubada e lavada, como descrito anteriormente. Depois de seca, colocou-se duas gotas de glicerina, cobrindo-se com lamínula 24 x 60 x 0,18 mm, examinando em microscópio de fluorescência (Zeiss SH250, Zeiss[®]) com objetiva de aumento de 40 vezes e ocular de aumento de 10 vezes.

4.3.5. Produção de antígeno para o método de aglutinação direta modificada (MAD)

Para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, utilizou-se como antígeno o fluido peritoneal de camundongos previamente infectados com *T. gondii*, cepa RH, preparado a partir do homogeneizado com igual volume de células de sarcoma TG180, obtidas por passagens sucessivas em camundongos albinos Swiss com idade de 30 a 40 dias previamente inoculados pela via intraperitoneal com 0,2mL, a cada 12 dias. A suspensão de sarcoma e taquizoítos foi inoculada via intraperitoneal em camundongos, e após 48 horas, procedeu-se o lavado peritoneal com 10mL de SSTF pH 7.2. Os fluidos peritoneais ricos em células parasitadas foram tratados com solução de tripsina a 0,05% para rompimento das células e liberação dos parasitos. A suspensão de taquizoítos foi fixada em solução de formalina a 6% por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente a formalina foi removida por meio de centrifugações sucessivas a 1200 x g por 10 minutos, sendo o antígeno ressuspenso em tampão borato pH 8.7 (DESMONTS e REMINGTON, 1980). A diluição de uso do antígeno foi determinada pelo teste de várias diluições frente a soros controle positivos e negativos.

4.3.6. Método de Aglutinação Direta (MAD)

Os soros foram diluídos em SSTF pH 7.2 na diluição 1:16 semelhante a RIFI, sendo transferidos 25 μ L de cada diluição para microplaca com fundo em V, adicionando-se então 25 μ L de 2-mercaptoetanol 0,1M e 50 μ L

de antígeno por cavidade da microplaca. As placas foram incubadas a temperatura 37°C por seis a 12 horas, sendo consideradas positivas aquelas diluições dos soros em que se formava uma película que cobria pelo menos 50% da cavidade, e negativas quando se formava botão ou anel no fundo da cavidade (Figura 1).

4.3.7. Inoculação dos animais

Para inoculação das ratas utilizou-se a cepa BTU4 isolada de cérebro de um cão, com sintomatologia nervosa atendido no ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, campus de Botucatu-SP. Esta cepa pertence ao genótipo I, e é mantida por inoculação intraperitoneal semanal (Figura 2), em camundongos Swiss albinos de 30 dias, com 1mL de exsudato peritoneal obtido de camundongos previamente infectados. Esta cepa apresenta comportamento patogênico para camundongos albinos e formação de cistos teciduais cerebrais em ratos. Para a inoculação das ratas o tecido cerebral dos camundongos infectados foi submetido à separação dos cistos teciduais de *T. gondii* para obtenção de bradizoítos por meio da pepsinização, de acordo com Dubey (1998a), descrita originalmente para ratos.

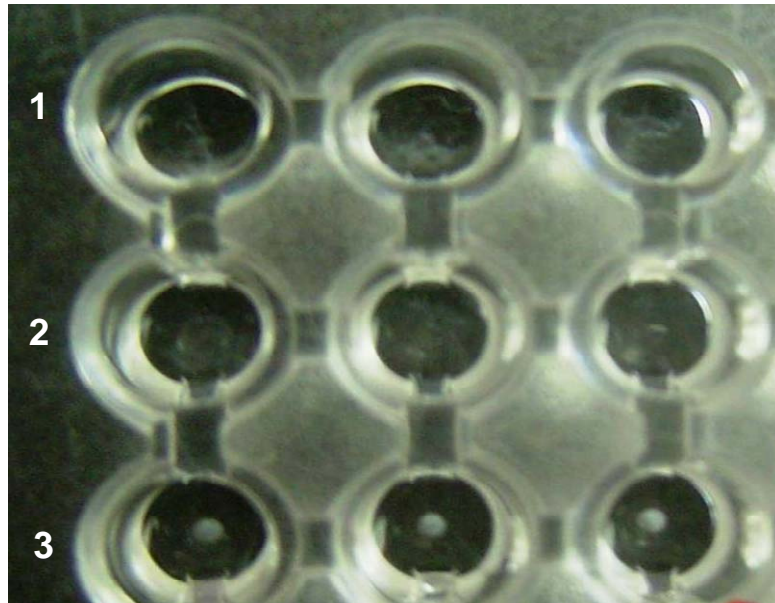


Figura 1. Reação de aglutinação em amostras de soro. 1) Controle sabidamente positivo, 2) Amostra testada e positiva, 3) Controle sabidamente negativo. Botucatu, 2008.

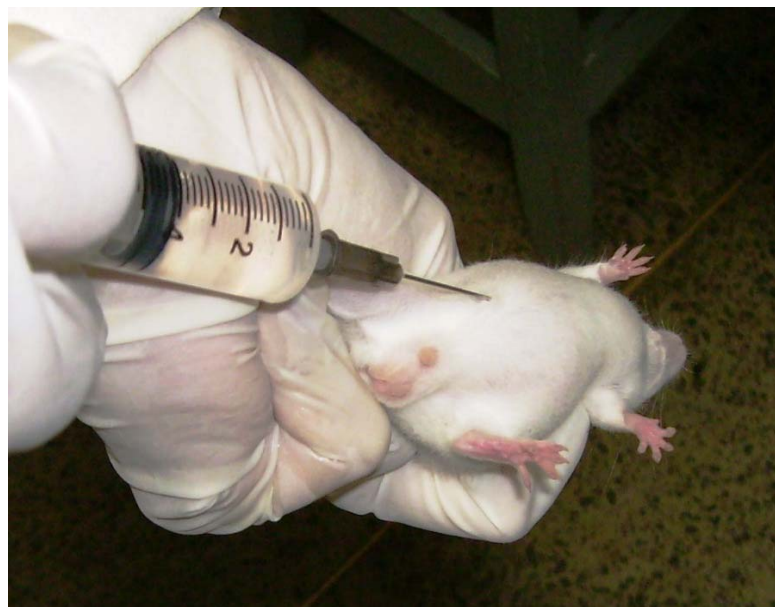


Figura 2. Inoculação de taquizoítos via intraperitoneal em camundongos Swiss albinos de 30 dias de idade para produção de antígeno, utilizado na inoculação experimental. Botucatu, 2008.

Os camundongos inoculados com a cepa BTU4 foram tratados com sulfadiazina (400mg sulfadiazina e 10g de bicarbonato de sódio/L de água), na água de bebida, do 3^o ao 20^o dia pós-inoculação (dpi), de acordo com o protocolo de Villard et al. (1997).

Com a infecção prévia de 60 dias os animais soropositivos para RIFI e MAD, foram eutanasiados em câmara saturada de isofluorano. Os cérebros foram removidos assepticamente e lavados com 5mL de solução salina 0,9%/cérebro para remover as hemácias aderidas. Foram incubados a temperatura de 4^oC por 12 horas em 4mL de solução salina 0,9%/cérebro e posteriormente homogeneizados por meio de passagens sucessivas em seringa com agulha 30 x 7. O material foi transferido para tubo de centrifuga e adicionado Percoll a 25% e centrifugado a 2000 x g por 30 minutos, em posição "brake off". O tecido cerebral foi removido cuidadosamente da superfície do tubo, deixando apenas 0,5mL no tubo. Resuspendeu-se o sedimento com 10mL de solução salina 0,9%, centrifugou-se novamente a 1200 x g por 10 minutos, em posição "brake off". Descartou-se o sobrenadante, resuspendendo-se em 1mL de solução salina 0,9%, procedendo-se a contagem de cistos em microscópio óptico, em alíquota de 8µL da suspensão entre lâmina e lamínula 22 x 22 (Figura 3). O material foi submetido à técnica de digestão em solução ácida de pepsina segundo Dubey (1998a), para liberação dos bradizoítos do interior dos cistos. Completou-se o volume da suspensão de cistos com 10 mL de solução salina 0,9%, adicionando-se 10mL de solução ácida de pepsina previamente aquecida a 37^oC por 5 minutos, sob agitação constante. Em seguida a suspensão foi neutralizada com solução de bicarbonato de sódio 1,2% e centrifugada a 1200 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ressuspendido com solução salina 0,9% para 1mL. Os bradizoítos foram contados em câmara de Newbauer. A concentração do número de bradizoítos foi ajustada para 10⁴ bradizoítos em 100µL de suspensão, para utilização como inóculo para as ratas do experimento.

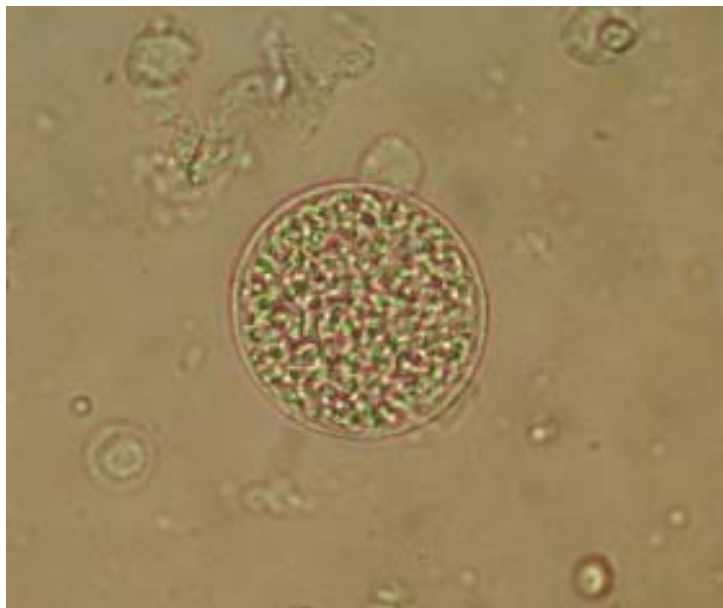


Figura 3. Cisto de *T. gondii* obtido pelo método de separação de cistos pelo Percoll 25% em tecido cerebral de camundongo infectado com a cepa BTU4. Aumento de 1000x. Botucatu, 2008.

4.4. Infecção experimental

As fêmeas inoculadas com a cepa BTU4 receberam 10^4 bradizoítos em 100 μ L de suspensão pela via oral, por gavagem. As ratas do G1 e G2 foram infectadas 60 dias antes do acasalamento e as ratas do G3 após o parto.

4.5. Acasalamento

Machos e fêmeas inicialmente foram avaliados de acordo com a idade entre 100 a 120 dias, e com peso entre 250 a 300g, para posterior acasalamento, assegurando assim a maturidade sexual dos animais. Os três grupos foram submetidos ao acasalamento na proporção de um macho para cada três fêmeas, mantidas em caixas de polipropileno 41 x 34 x 16 cm, piso coberto com maravalha autoclavada, acondicionadas em estante ventilada, oferecendo-se ração comercial e água filtrada por osmose reversa (Quimis[®]) *ad*

libitum em estante ventilada Alesco[®], permanecendo no infectório do NUPEZO. As fêmeas foram inspecionadas diariamente para observação do tampão vaginal mucoso, sendo designado “dia 0” o dia desta observação, considerando-se como início da prenhez (ROBERTS e ALEXANDER, 1992), já que esta característica evidencia a ocorrência da cópula durante as 24 horas anteriores (HARKNESS e WAGNER, 1993). Depois de constatada a presença desta secreção, permaneceram nas caixas apenas as fêmeas. A partir do 18^o dia de prenhez, foram separadas em caixas individuais e acompanhadas diariamente até o momento do parto.

4.6. Anestesia e eutanásia dos animais experimentais

Utilizou-se 25mg/Kg de cloridrato de cetamina via intramuscular para anestesia dos grupos experimentais, para coleta de leite e sangue. Para eutanásia utilizou-se câmara saturada de vapor de isoflurano (BRASIL, 2005).

4.7. Redução da ninhada

Devido ao elevado número de nascidos/mãe e a incapacidade fisiológica da sobrevivência de todos os filhotes, procedeu-se a redução dos mesmos. Desta forma, optou-se por deixar a ninhada com o número de seis filhotes por rata.

4.8. Coleta das amostras

4.8.1. Sangue

As amostras sanguíneas foram coletadas pela punção do plexo retro-orbital dos animais com auxílio de tubos capilares, em microtubos de plástico de 1,5mL. Foram dessoradas após retração do coágulo e centrifugadas a 2500 x g por 10 minutos, acondicionando-se os soros em novos microtubos

de plástico de 1,5mL, identificados e mantidos em freezer a -20°C até o momento da realização das provas sorológicas.

4.8.2. Leite

Para auxiliar na coleta da secreção láctea utilizou-se 1 mL (5 UI) de ocitocina via intraperitoneal (LEITE et al., 2002), procedendo a ordenha manual das mamas utilizando-se pipeta pasteur descartável estéril, realizando anti-sepsia prévia, com álcool iodado (Figura 4). Convencionou-se o volume de $300\mu\text{L}$ de amostra de leite e seis coletas intercalando os dias de coleta até a 3^a coleta, e a partir da 4^a coleta, estabeleceu-se o intervalo de dois dias até o 15^o dia de lactação, já que após 18 dias de parição, a rata começa a rejeitar os filhotes nas suas tentativas de mamar e, gradualmente, os desmamam (BROWN, 1998). Há decréscimo nos níveis de hormônios lactogênicos e estase de leite nos alvéolos, ocorrendo à involução da glândula mamária (QUARRIE et al., 1996).

Para o G1 e G2 a primeira coleta foi no segundo dia após a parição e para G3 a coleta iniciou-se no 1^o dpi. As amostras foram armazenadas individualmente em microtubos de 1,5mL estéreis, identificados e mantidos sob congelamento a -80°C para realização da PCR. Confeccionou-se esfregaço da secreção láctea, em lâminas para microscopia que foram fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa.

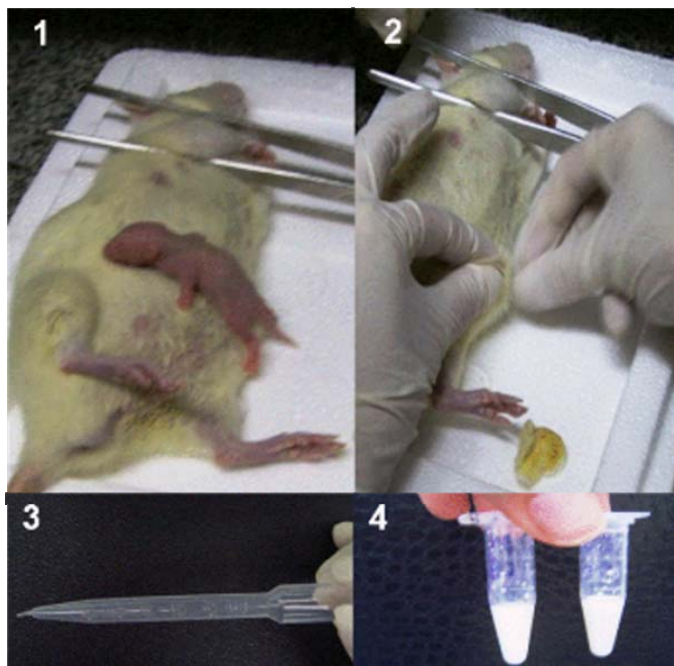


Figura 4. Demonstração da coleta de leite. 1) Preparação do animal anestesiado para coleta de leite; 2) massagem da glândula mamária após a aplicação de ocitocina; 3) pipeta pasteur estéril e descartável para coletar a amostra; 4) leite coletado e armazenado em microtubo. Botucatu, 2008.

4.8.3. Amostras teciduais

Coletou-se com auxílio de tesouras e pinças estéreis, sob capela de fluxo laminar os cérebros, fígados, pulmões, musculatura estriada esquelética, cardíaca, diafragma, língua tanto das ratas e filhotes e tecido glandular mamário somente nas ratas mães, separando-os em duas alíquotas, uma individual e a outra em *pool*. Confeccionaram-se lâminas com *imprints* de tecido glandular mamário que foram fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa. As amostras individuais foram colocadas, em cadinhos de porcelana estéreis e maceradas em gral com pistilo, e resuspendidas em água ultra-pura, na proporção aproximada de 1:2 para cérebro, fígado, pulmão, coração, língua, diagrama, e 1:3 para musculatura estriada esquelética e tecido glandular mamário, sendo acondicionadas em microtubos de 1,5mL e congeladas a -80°C até o momento do processamento. Já as amostras em *pool* dos tecidos foram trituradas em homogeneizador vertical Black & Decker[®].

4.9. Exames realizados

4.9.1. Sorológico

Todas as amostras de soro coletadas durante o experimento foram submetidas às provas sorológicas RIFI e MAD, para pesquisa de anticorpos das classes IgG, com descrito anteriormente.

4.9.2. Citologia

O tecido mamário das mães e a secreção láctea foram examinados utilizando-se o método de Giemsa, para pesquisa de taquizoítos e cistos, em microscopia óptica por imersão (aumento de 1000 vezes).

4.9.3. Inoculação em camundongos - Bioprova

O *pool* de órgãos das ninhadas e respectivas mães foram divididos em duas partes, a primeira parte foi submetida à técnica de digestão em solução ácida de pepsina segundo Dubey (1998a), e outra parte processada *in natura*. Ambas as amostras (digeridas e *in natura*), foram inoculadas pela via subcutânea, em três camundongos Swiss de 30 dias, sendo observados por um período de 60 dias. Os animais que desenvolveram sinais clínicos foram eutanasiados, e dos que vieram a óbito, examinou-se o exsudato peritoneal, para a pesquisa de taquizoítos de *T.gondii*. Dos assintomáticos, coletou-se sangue para a obtenção de soro, e realização da RIFI e MAD. Foram consideradas positivas as amostras que revelaram taquizoítos no exsudato peritoneal, ou aquelas reagentes para RIFI e para MAD, com título mínimo de 16 para ambas as provas sorológicas.

4.9.4. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA de *T. gondii* no leite e nos tecidos foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos TOX4 e TOX5 (Quadro 1), segundo descrito por Homan et al. (2000), amplificando uma região de 529 pares de base (pb).

Quadro 1. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção (TOX4 e TOX5) de *Toxoplasma gondii*, em amostras de leite materno e tecidual.

Oligonucleotídeos	Seqüência de bases
TOX4	5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3'
TOX5	5'CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT3'

4.9.4.1. Extração e purificação de DNA

Para extração e purificação de DNA das amostras de leite e tecidos utilizou-se o kit de extração, GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences), pelo método proporcional (scalable method) com algumas alterações (Anexo D), e o Blood genomicPre Mini Spin Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences), respectivamente conforme instrução do fabricante (Anexo E).

4.9.4.2. Amplificação de DNA

Cada tubo de reação de 0,2mL recebeu 2,5µL de tampão de PCR (50mmol KCl, 10mmol Tris-HCl), 0,75µL de MgCl (1,5mmol), 0,25µL da solução de deoxinucleotídeos (1,25 mmol), 0,15U/µL de taq-polimerase (Invitrogen), 5µL de cada oligonucleotídeos TOX4 e TOX5 (10µM/µL - dialab), 10µL de amostra obtida no final da extração e 17,35µL de água ultra-pura. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research®, em 35 ciclos onde consistiu na desnaturação, anelamento e extensão e um ciclo final para completar a extensão dos amplicons (Quadro 2).

Quadro 2. Etapas da amplificação das regiões codificadoras dos oligonucleotídeos utilizados na detecção (TOX4 e TOX5) de *Toxoplasma gondii*.

Etapas	Nº de ciclos	Período (minutos)	Temperatura (°C)
Desnaturação	1	7	94
Anelamento	35	1	72
Extensão dos amplicons	1	10	72

4.9.4.3. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados na PCR

Para cada amostra de 10µL submetida à amplificação adicionou-se 2µL de uma solução de azul de bromofenol (0,15g Tris-hidroximetil-aminometano-Tris + 1mg azul de bromofenol + 4g sacarose + 10mL água deionizada). Após homogeneização, esta solução foi submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0% com tampão tris-borato-EDTA 0,5x (54g Tris-hidroximetil-aminometano-Tris + 27,5g ácido bórico + 20mL solução estoque de EDTA 0,5M + 980mL água deionizada). A corrida foi realizada a 100 voltz por aproximadamente 60 minutos. Após a corrida, o gel foi submerso em solução de brometo de etídeo (5µL brometo de etídeo + 20mL tampão tris-borato-EDTA 5x + 80mL água deionizada), por aproximadamente 40 minutos e a visualização das bandas, indicativas da presença de *T. gondii*, realizada em transiluminador ultravioleta, com filtro de 300nm. Os géis foram fotografados utilizando-se sistema fotográfico Polaroid®.

4.9.4.4. Limiar de detecção de *T. gondii* para amostras de leite e tecidos

As técnicas de extração, purificação, PCR e eletroforese foram testadas em amostras de leite de ratas e em diferentes amostras de tecidos sabidamente negativas para *T. gondii*, que foram contaminadas experimentalmente com uma suspensão de $1,5 \times 10^6$ taquizoítos por mL de *T.*

gondii, cepa BTU4, contados em câmara de Neubauer, diluída com SSTF pH 7.2 estéril nas concentrações aproximadas de $1,5 \times 10^0$, $1,5 \times 10^1$, $1,5 \times 10^2$, $1,5 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^4$ por mL de suspensão de cada amostra de leite e tecido.

4.9.4.5. Controles

Para cada seqüência de extração e PCR de leite e tecidos foram utilizados controles positivo e negativo. Para o leite utilizou-se como controle positivo amostras de leite de ratas contaminadas com *T.gondii*, na concentração de $2,0 \times 10^2$ taquizoítos/mL. Para os tecidos utilizou-se as concentrações de $2,0 \times 10^2$ taquizoítos/mL, para as amostras de suspensão de cérebro, pulmão e língua e de $2,0 \times 10^3$ taquizoítos/mL para amostras de musculatura cardíaca e esquelética, fígado, diagrama e tecido mamário. Como controle negativo utilizou-se água ultra-pura para todas as amostras a serem testadas.

4.10. Análise estatística*

Os resultados obtidos foram analisados pelos testes estatísticos não paraméricos de Wilcoxon, Mann-Whitney, McNemar e Exato de Fisher para as sorologias e o teste de Log-Rank para análise do leite quando utilizou-se a coloração de Giemsa e PCR. Os demais resultados foram analisados descritivamente. Para todas as análises foi considerado um nível de significância $\alpha = 0,05$.

* Consultoria Técnica na análise de dados: Prof. Dr. Aristeu Vieira Silva. Mestrado em Ciência Animal, Universidade Paranaense/UNIPAR - Umuarama/PR.

5. RESULTADOS

5.1. Animais experimentais

Durante o experimento, os animais do G1 e G3 tanto ratas mães como filhotes não apresentaram sinais clínicos pertinentes à infecção toxoplásmica. No G2, ocorreu óbito de três ratas e das ninhadas de todas as ratas deste grupo. Verificaram-se principalmente alterações clínicas, como prostração, queda de pêlos e perda de peso. O exsudato peritoneal desde animais, não revelou formas taquizoíticas do parasito. Para os animais deste mesmo grupo calculou-se a mediana de dias de sobrevivência, que foi de 13 dias nas ratas e nove dias nos neonatos. Ainda dos animais do G2 que morreram os *imprints* de fígado revelaram formação de granulomas de dimensões variáveis, constituídos por células pleomórficas apresentando citoplasma alongado e levemente acidofílico, e contendo núcleo central com um único nucléolo e predomínio de neutrófilos degenerados. No pulmão observou-se necrose e descamação do epitélio bronquiolar com infiltrados inflamatórios compostos por células mononucleares no parênquima pulmonar.

5.2. Exames sorológicos

Os resultados dos exames sorológicos pela RIFI e MAD para detecção de IgG são apresentados na tabela 1, indicando a mediana dos títulos de cada grupo experimental das ratas infectadas nos diferentes momentos de coleta de amostras. A comparação entre os testes sorológicos dos animais do mesmo grupo em um mesmo momento, e também, a comparação entre grupos para o mesmo teste e momento, observando uma maior sensibilidade da MAD. As figuras 6 a 8 demonstram graficamente os mesmos dados indicando a média em log dos títulos de cada grupo experimental nos diferentes momentos de coleta das amostras. Ainda, nestas figuras observa-se um aumento considerável de título de anticorpos anti-*T. gondii* com 30 dias pós infecção (dpi) tanto na RIFI com na MAD para os animais do G1 e G2, elevando-se até 45dpi, momento em que se estabilizou. No momento 21 colheu-se amostra somente para os animais do G3, grupo com infecção aguda, analisando-se ambas as provas sorológicas.

Os resultados evidenciaram que todos os animais dos grupos G1 e G2, soroconverteram após 30 dias de infecção, ao contrário dos animais do G3. Todos os títulos individuais de cada grupo são apresentados nas tabelas 14, a 16 no anexo B.

O resultado da sorologia dos filhotes, estão apresentados nas tabelas 2 e 3 onde pode-se comparar os resultados dos testes sorológicos entre os filhotes do mesmo grupo, G1 e G3 respectivamente. Apenas os filhotes de G1 apresentaram diferença estatística significativa entre os testes. Quando comparados os teste RIFI x MAD entre os filhotes de G1 x G3, observa-se diferença significativa para ambos os testes (Tabelas 4 e 5).

Com a morte dos filhotes do G2, não foi possível a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*. A mediana de dias de sobrevivência dos neonatos deste grupo foi de nove dias, variando de 6 a 16 dias.

Tabela 1. Resultado do exame sorológico pela RIFI a MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T.gondii*, nas fêmeas inoculadas. Botucatu, 2008.

Grupo	Método	Estatística	Momento						
			15	21	30	45	60	75	90
G1	RIFI	Mediana	8 ^{Aa}	-	256 ^{Ab}	640 ^{Aa}	640 ^{Aa}	640 ^{Aa}	256 ^{Aa}
		P25	0	-	256	256	256	256	256
		P75	52	-	256	1024	1024	1024	832
	MAD	Mediana	64 ^{Ba}	-	1024 ^{Aa}	1024 ^{Ba}	1024 ^{Ba}	1024 ^{Ba}	1024 ^{Ba}
		P25	64	-	1024	1024	1024	1024	1024
		P75	64	-	3328	3328	3328	3328	3328
G2	RIFI	Mediana	8 ^{Aa}	-	64 ^{Aa}	256 ^{Aa}	256 ^{Aa}	256 ^{Aa}	256 ^{Aa}
		P25	0	-	64	256	256	256	256
		P75	16	-	64	256	256	256	256
	MAD	Mediana	64 ^{Aa}	-	640 ^{Aa}	640 ^{Aa}	1024 ^{Aa}	1024 ^{Ba}	1024 ^{Ba}
		P25	16	-	256	256	1024	1024	1024
		P75	64	-	1024	1024	1024	1024	1024
G3	RIFI	Mediana	16 ^{Aa}	16 ^A					
		P25	4	16					
		P75	16	16					
	MAD	Mediana	64 ^{Ba}	64 ^B					
		P25	28	28					
		P75	64	64					

Estatística: Para um mesmo grupo e momento, valores de mediana seguidos de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os testes de detecção de anticorpos, pelo teste de Wilcoxon, para um $\alpha=0,05$.

Para um mesmo teste e momento, valores de mediana seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis (momento 15) ou pelo teste de Mann-Whitney (outros momentos), para um $\alpha=0,05$.

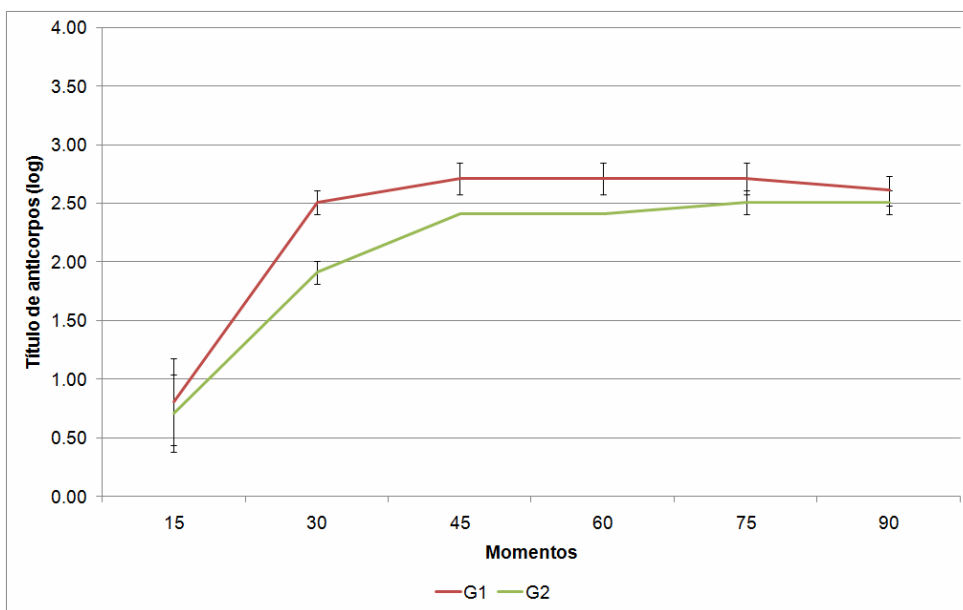


Figura 5. Dinâmica dos títulos de anticorpos séricos anti-*T. gondii*, detectados pela RIFI, nas ratas do G1 e G2 infectadas experimentalmente com 10^4 bradizoítos pela via oral com a cepa BTU4. Botucatu, 2008.

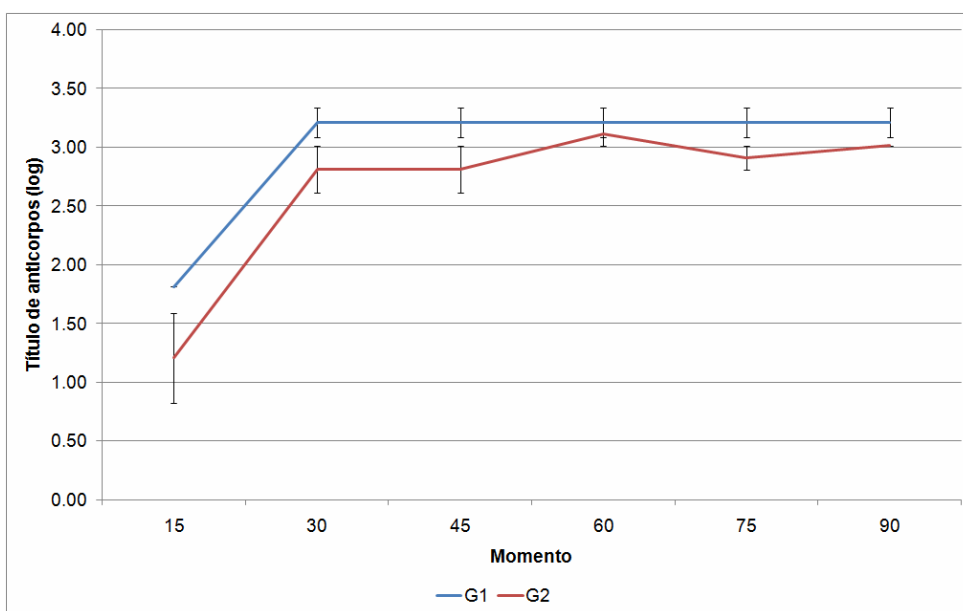


Figura 6. Dinâmica dos títulos de anticorpos séricos anti-*Toxoplasma gondii*, detectados pelo método de aglutinação direta, nas ratas do G1 e G2 infectadas experimentalmente com 10^4 bradizoítos pela via oral com a cepa BTU4. Botucatu, 2008.

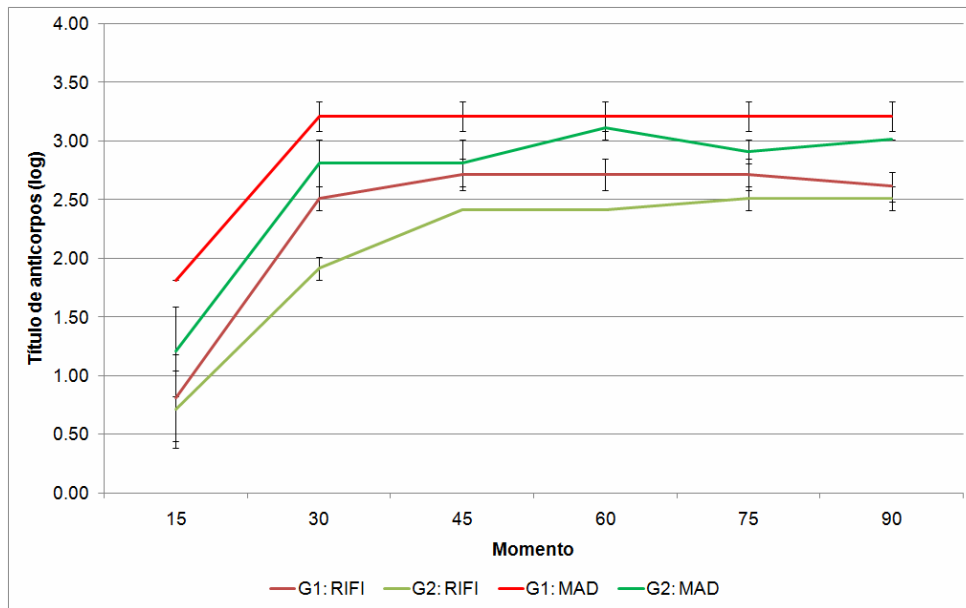


Figura 7. Dinâmica dos títulos de anticorpos séricos anti-*T. gondii*, detectados pela RIFI e pelo MAD do G1 e G2 infectadas experimentalmente com 10^4 bradizoítos pela via oral com a cepa BTU4. Botucatu, 2008.

Tabela 2. Resultado do exame sorológico para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T.gondii*, em soros dos filhotes do G1 comparando RIFI x MAD. Botucatu, 2008.

		MAD		
		Positivo	Negativo	Total
RIFI	Positivos	29	0	29
	Negativos	7	0	7
Total		36	0	36

Estatística: $p=0,0233$, ou seja, houve diferença entre os grupos, pelo teste de McNemar, com uma concordância de $89,23\% \pm 4,05\%$ (IC95%: 81,30-97,16) entre os testes.

Tabela 3. Resultado do exame sorológico para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T.gondii*, em soros dos filhotes do G3 comparando RIFI x MAD. Botucatu, 2008.

		MAD		
		Positivo	Negativo	Total
RIFI	Positivos	29	0	29
	Negativos	7	0	7
Total		36	0	36

Estatística: $p=1,0000$, ou seja, não houve diferença entre os grupos, pelo teste de McNemar, com uma concordância de $97,22\% \pm 2,74\%$ (IC95%: 85,47-99,93) entre os testes.

Tabela 4. Resultado do exame sorológico pela RIFI para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T.gondii*, em soros dos filhotes do G1 x G3. Botucatu, 2008.

		Grupo		
		G1	G3	Total
RIFI	Positivos	29	3	32
	Negativos	7	33	40
Total		36	36	72

Estatística: $p < 0,0001$, ou seja, houve diferença entre os grupos, com um risco relativo de positivos em G1 de 5,18 (IC95%: 2,62-10,24) em relação a G3, pelo teste Exato de Fischer.

Tabela 5. Resultado do exame sorológico pela MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T. gondii*, em soros dos filhotes G1 x G3. Botucatu, 2008.

		Grupo		
		G1	G3	Total
MAD	Positivos	36	4	40
	Negativos	0	32	32
Total		36	36	72

Estatística: $p < 0,0001$, ou seja, houve diferença entre os grupos, pelo teste Exato de Fischer.

5.3. Citologia

Na figura 6, observam-se formas sugestivas de taquizoítos de *T. gondii*. Os *imprints* dos tecidos mamários mostraram-se negativos.

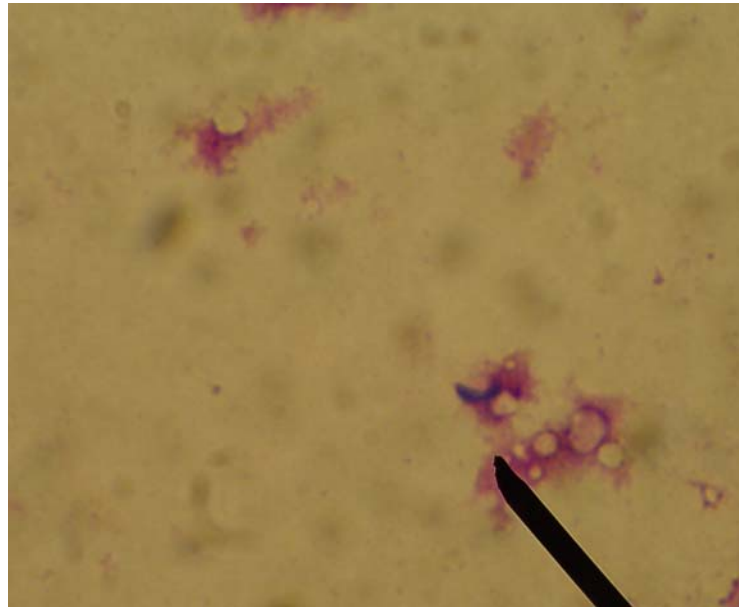


Figura 8. Formas sugestivas de taquizoítos em esfregaço de amostra de leite. Coloração pelo método de Giemsa. Aumento 40x. Botucatu, 2008.

Na tabela 6 podem ser observados os resultados dos exames citológicos da secreção láctea que apresentaram formas sugestivas de *T.gondii*. Realizou-se a comparação nos achados das formas sugestivas do parasito nos *imprints* de leite, observando somente diferença estatística significativa entre os animais do G1 x G2.

Tabela 6. Detecção de formas sugestivas de *T. gondii* em esfregaços de secreção láctea coletada durante os 15 primeiros dias de lactação. Botucatu, 2008.

Fêmeas	Coletas																	
	1 ^a			2 ^a			3 ^a			4 ^a			5 ^a			6 ^a		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
1	FS	FS	FS	FS	N	S/A	N	FS	N	N	FS	N	N	N	N	N	N	N
2	FS	FS	FS	FS	N	FS	N	N	FS	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	FS	FS	FS	FS	N	FS	N	FS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	FS	FS	FS	N	FS	N	N	N	FS	N	O	N	N	O	N	N	O	N
5	FS	FS	FS	N	FS	N	FS	N	N	N	S/A	N	N	N	N	N	S/A	N
6	FS	FS	FS	N	FS	FS	N	FS	N	N	S/A	N	N	S/A	N	N	S/A	N
Total FS	6/6	6/6	6/6	3/6	3/6	3/5	1/6	3/6	3/6	0/6	1/3	0/6	0/6	0/4	0/6	0/6	0/3	0/6
Total N	0/6	0/6	0/6	3/6	3/6	2/5	5/6	3/6	3/6	0/6	2/3	6/6	6/6	4/4	6/6	6/6	3/3	6/6

FS: formas sugestivas de taquizoítos; N: negativos; S/A: sem amostras; O: óbito.

Estatística: G1 ≠ G2 (p=0,0117); G1 = G3 (p=0,6527); G2 = G3 (p=0,0543) pelo teste de Log-Rank com dados censurados, considerando-se $\alpha=0,05$.

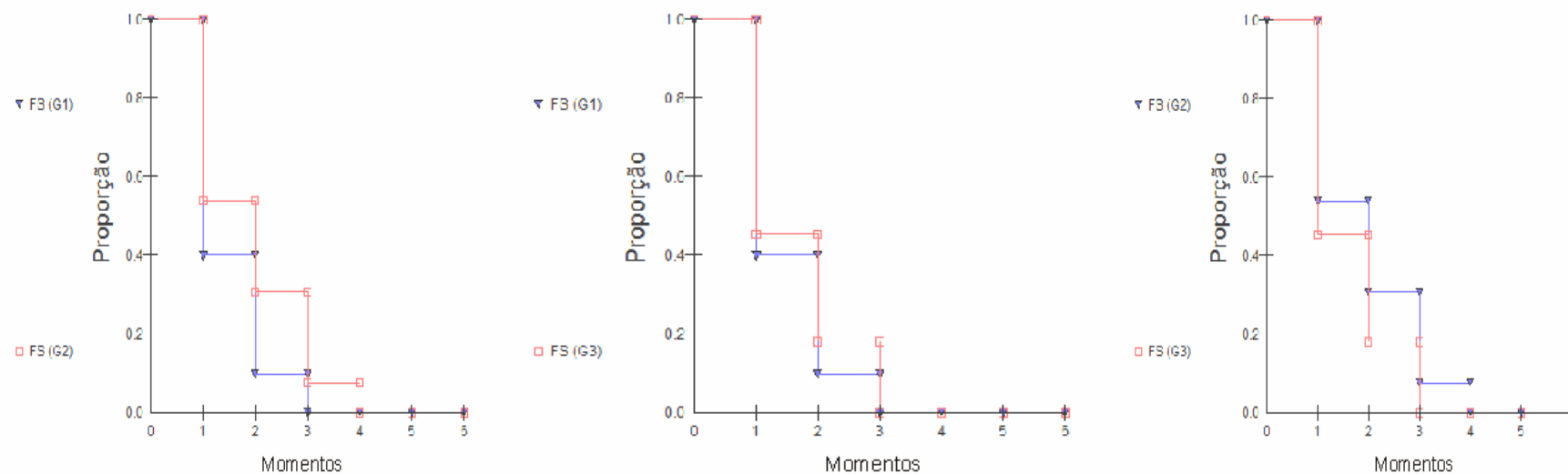


Figura 9. Proporção de detecção de formas sugestivas de *T. gondii* no leite das ratas G1 x G2 (esquerda), G1 x G3 (centro), G2 x G3 (direita) infectadas experimentalmente com 10^4 bradizoítos pela via oral com a cepa BTU4. Botucatu, 2008.

5.4. Inoculação em camundongos - Bioprova

A maioria dos camundongos inoculados com o *pool* de tecidos tanto das amostras digeridas como *in natura*, não morreram e não apresentaram alterações clínicas, sendo eutanasiados após 60 dias de observação, para realização da sorologia. Dos que morreram o exsudato peritoneal, não apresentou formas taquizoíticas para confirmação do diagnóstico. As tabelas 7 a 9 mostram os resultados incluindo-se a sorologia pela RIFI e MAD dos camundongos inoculados com *pool* de tecidos das ratas e filhotes de cada grupo. No G2, foi possível realizar apenas a inoculação em camundongos com amostras provenientes das fêmeas do grupo, pois suas respectivas ninhadas morreram. Observou-se sorologia positiva nos camundongos somente na MAD.

Tabela 7. Resultados referentes à sorologia dos camundongos inoculados com *pool* de tecidos dos animais do G1 e das respectivas ninhadas. Botucatu, 2008.

Camundongos	MAD (DIG)	RIFI (DIG)	Camundongos	MAD (CRU)	RIFI (CRU)
M1.1	N	N	M1.1	64	N
M1.2	N	N	M1.2	16	N
M1.3	N	N	M1.3	M*	M*
F1.1	N	N	F1.1	N	N
F1.2	N	N	F1.2	N	N
F1.3	N	N	F1.3	N	N
M2.1	M*	M*	M2.1	M*	M*
M2.2	M*	M*	M2.2	N	N
M2.3	N	N	M2.3	N	N
F2.1	N	N	F2.1	N	N
F2.2	N	N	F2.2	N	N
F2.3	N	N	F2.3	N	N
M3.1	N	N	M3.1	N	N
M3.2	N	N	M3.2	N	N
M3.3	N	N	M3.3	N	N
F3.1	N	N	F3.1	N	N
F3.2	N	N	F3.2	N	N
F3.3	N	N	F3.3	N	N
M4.1	N	N	M4.1	N	N
M4.2	N	N	M4.2	N	N
M4.3	N	N	M4.3	N	N
F4.1	N	N	F4.1	N	N
F4.2	N	N	F4.2	N	N
F4.3	N	N	F4.3	N	N
M5.1	N	N	M5.1	N	N
M5.2	N	N	M5.2	N	N
M5.3	N	N	M5.3	N	N
F5.1	N	N	F5.1	N	N
F5.2	N	N	F5.2	N	N
F5.3	N	N	F5.3	N	N
M6.1	N	N	M6.1	M*	M*
M6.2	N	N	M6.2	M*	M*
M6.3	N	N	M6.3	N	N
F6.1	N	N	F6.1	M*	M*
F6.2	N	N	F6.2	M*	M*
F6.3	N	N	F6.3	N	N

M_{x.y} = camundongo inoculado com *pool* de tecidos da rata x, sendo y o número de camundongos inoculados (para cada amostra foram inoculados três camundongos). F_{x.y} = camundongo inoculado com *pool* de tecidos dos filhotes da ninhada da rata x, sendo y o número de camundongos inoculados (para cada amostra foram inoculados três camundongos).

DIG = Amostra inoculada a partir de tecido digerido pela pepsina; CRU = Amostra inoculada a partir de tecido *in natura*; N= Negativo; M* = Animal veio a óbito e coletado exsudato peritoneal, mas não encontrou-se formas taquizoíticas do *T. gondii*.

Tabela 8. Resultados referentes à sorologia dos camundongos inoculados com *pool* de tecidos dos animais do G2. Botucatu, 2008.

Camundongos	MAD (DIG)	RIFI(DIG)	Camundongos	MAD (CRU)	RIFI (CRU)
M1.1	N	N	M1.1	N	N
M1.2	N	N	M1.2	N	N
M1.3	N	N	M1.3	N	N
M2.1	N	N	M2.1	N	N
M2.2	N	N	M2.2	N	N
M2.3	N	N	M2.3	N	N
M3.1	N	N	M3.1	N	N
M3.2	N	N	M3.2	N	N
M3.3	N	N	M3.3	N	N
M4.1	M*	M*	M4.1	M*	M*
M4.2	M*	M*	M4.2	M*	M*
M4.3	M*	M*	M4.3	M*	M*
M5.1	N	N	M5.1	N	N
M5.2	N	N	M5.2	N	N
M5.3	N	N	M5.3	N	N
M6.1	N	N	M6.1	N	N
M6.2	N	N	M6.2	N	N
M6.3	N	N	M6.3	N	N

M_{x.y} = camundongo inoculado com *pool* de tecidos da rata x, sendo y o número de camundongos inoculados (para cada amostra foram inoculados três camundongos)

DIG = Amostra inoculada a partir de tecido digerido em pepsina; CRU = Amostra inoculada a partir de tecido *in natura*; N= Negativo; M* = Animal veio a óbito e coletado exsudato peritoneal, mas não encontrou-se formas taquizoíticas do *T. gondii*.

Tabela 9. Resultados referentes à sorologia dos camundongos inoculados com *pool* de tecidos dos animais do G3 e das respectivas ninhadas. Botucatu, 2008.

Camundongos	MAD (DIG)	RIFI (DIG)	Camundongos	MAD (CRU)	RIFI (CRU)
M1.1	16	N	M1.1	N	N
M1.2	N	N	M1.2	N	N
M1.3	N	N	M1.3	N	N
F1.1	N	N	F1.1	N	N
F1.2	N	N	F1.2	N	N
F1.3	N	N	F1.3	N	N
M2.1	N	N	M2.1	N	N
M2.2	N	N	M2.2	N	N
M2.3	N	N	M2.3	N	N
F2.1	N	N	F2.1	N	N
F2.2	N	N	F2.2	N	N
F2.3	N	N	F2.3	N	N
M3.1	N	N	M3.1	N	N
M3.2	N	N	M3.2	N	N
M3.3	N	N	M3.3	N	N
F3.1	16	N	F3.1	16	N
F3.2	16	N	F3.2	16	N
F3.3	N	N	F3.3	N	N
M4.1	N	N	M4.1	N	N
M4.2	N	N	M4.2	N	N
M4.3	N	N	M4.3	N	N
F4.1	N	N	F4.1	N	N
F4.2	N	N	F4.2	N	N
F4.3	N	N	F4.3	16	N
M5.1	N	N	M5.1	N	N
M5.2	N	N	M5.2	N	N
M5.3	N	N	M5.3	N	N
F5.1	N	N	F5.1	N	N
F5.2	N	N	F5.2	N	N
F5.3	N	N	F5.3	N	N
M6.1	N	N	M6.1	N	N
M6.2	N	N	M6.2	N	N
M6.3	N	N	M6.3	N	N
F6.1	N	N	F6.1	N	N
F6.2	N	N	F6.2	N	N
F6.3	N	N	F6.3	N	N

Mx.y = camundongo inoculado com *pool* de tecidos da rata x, sendo y o número de camundongos inoculados. F x.y = camundongo inoculado com *pool* de tecidos dos filhotes da rata x, sendo y o número de camundongos inoculados (para cada amostra foram inoculados três camundongos)

DIG = Amostra inoculada a partir de tecido digerido; CRU = Amostra inoculada a partir de tecido *in natura*; N= Negativo; M* = Animal veio a óbito e coletado exsudato peritoneal, mas não encontrou-se formas taquizoíticas do *T. gondii*.

5.5. PCR

5.5.1. Limiar de detecção de *T. gondii* para amostras de leite e tecidos

A reação em cadeia pela polimerase detectou concentrações variáveis de taquizoítos de *T. gondii*, de acordo com as amostras de leite e de tecidos examinados. A extração e purificação pelo kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences®), detectou até $1,5 \times 10^1$ e $1,5 \times 10^2$ taquizoítos/mL para suspensão pura do exsudato peritoneal e para as amostras de leite contaminadas com exsudato rico em taquizoítos respectivamente (Figura 11). Já para os tecidos utilizando o kit Blood Genomic Pre-Mini Spin Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences®) detectou-se até $1,5 \times 10^1$ para a amostra pura de exsudato rico em taquizoíto e amostras de suspensão cerebral, e $1,5 \times 10^2$ para amostras de pulmão, língua, diagrama, e $1,5 \times 10^3$ taquizoítos/mL, para as amostras de tecido hepático, cardíaco, musculatura estriada esquelética e glândula mamária (Figuras 12 e 13).

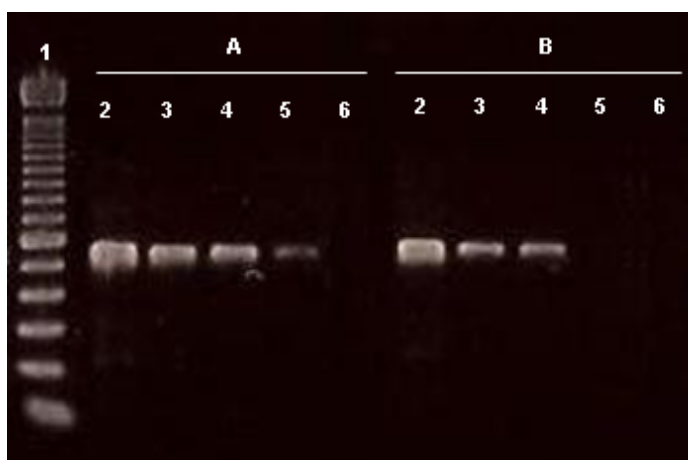


Figura 10 Visualização de banda de 529pb, em gel de agarose a 2%. Limiar de detecção da PCR para o gene repetitivo amplificado de segmento de DNA de *T. gondii* para amostras puras e de leite em diferentes concentrações. Amostras de exsudato peritoneal diluídas. (A) Amostras de leite contaminadas por exsudato peritoneal com taquizoítos (B). 1) Padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen®; 2) $1,5 \times 10^4$ taquizoítos/mL; 3) $1,5 \times 10^3$ taquizoítos/mL 4) $1,5 \times 10^2$ taquizoítos/mL; 5) $1,5 \times 10^1$ taquizoítos/mL; 6) $1,5 \times 10^0$ taquizoítos/mL.. Botucatu, 2008.

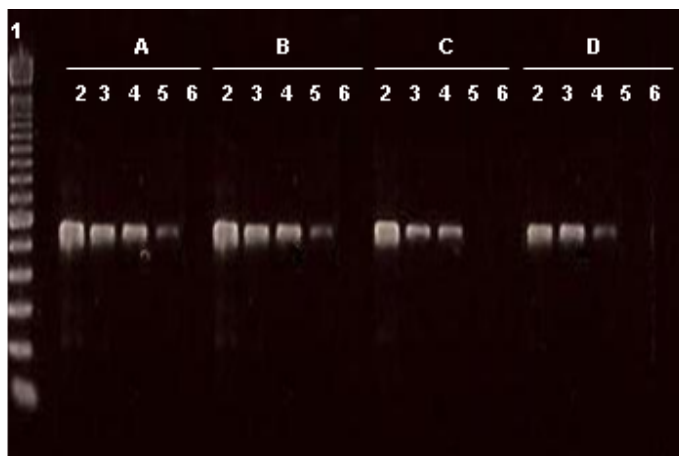


Figura 11 Visualização de banda de 529pb, em gel de agarose a 2%. Limiar de detecção da PCR para o gene repetitivo amplificado de segmento de DNA de *T. gondii* para amostras puras de exsudato peritoneal rico em taquizoíto e de leite em diferentes concentrações. Amostras de exsudato peritoneal diluídas (A); cérebro (B); pulmão (C) e língua (D). 1) Padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen®; 2) $1,5 \times 10^4$ taquizoítos/mL; 3) $1,5 \times 10^3$ taquizoítos/mL 4) $1,5 \times 10^2$ taquizoítos/mL; 5) $1,5 \times 10^1$ taquizoítos/mL; 6) $1,5 \times 10^0$ taquizoítos/mL.. Botucatu, 2008.

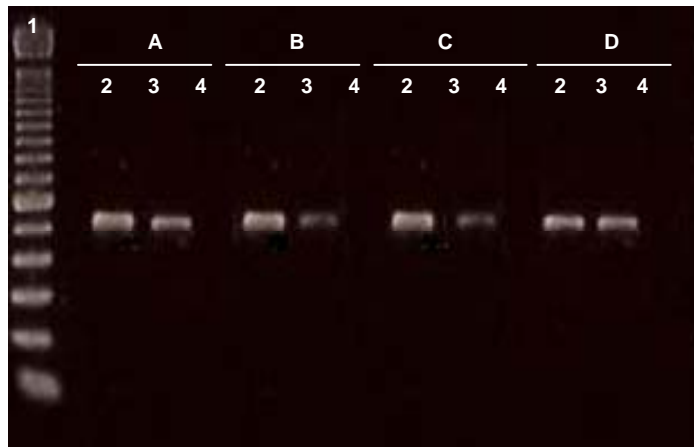


Figura 12. Visualização de banda de 529pb, em gel de agarose a 2%. Limiar de detecção da PCR para o gene repetitivo amplificado de segmento de DNA de *T. gondii* para amostras puras de exsudato peritoneal de rico em taquizoíto e de leite em diferentes concentrações. (A); coração (B); tecido mamário (C) e musculatura esquelética estriada (D). 1) Padrão de peso molecular 100 bp DNA-Ladder Invitrogen®; 2) $1,5 \times 10^4$ taquizoítos/mL; 3) $1,5 \times 10^3$ taquizoítos/mL. Amostra de tecido hepático Botucatu, 2008.

5.5.2. Detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite e teciduais

Os resultados da PCR das amostras de leite são apresentados na tabela 10, mostrando a comparação entre os grupos. A tabela 11 apresenta os resultados da PCR das amostras teciduais para os animais dos G1, G2 e G3. Para os tecidos provenientes dos filhotes, a PCR foi positiva nas amostras de fígado e musculatura esquelética de um filhote, e apenas na amostra de fígado de outro filhote da fêmea 3 do G1. Foi positiva ainda, a amostra de pulmão de um filhote da fêmea 4 pertencente a este mesmo grupo (Tabela 12). Os filhotes do G1 não apresentaram DNA do parasito em suas amostras teciduais pesquisadas e, os filhotes de G2 morreram, não sendo assim possível a realização do prova.

Tabela 10. Resultado da PCR nas seis amostras de leite coletadas durante os primeiros 15 dias de lactação, nas seis fêmeas de cada grupo. Botucatu, 2008.

Coletas																		
Coletas	1 ^a			2 ^a			3 ^a			4 ^a			5 ^a			6 ^a		
Fêmeas	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
1	P	N	N	N	N	S/A	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	O	N	N	O	N	N	O	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S/A	N	N	N	N	N	S/A	N	N
6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S/A	N	N	S/A	N	N	S/A	N	N
Total P	1/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/3	0/6	1/6	0/4	0/6	0/6	0/3	0/6
Total N	5/6	6/6	5/6	6/6	6/6	5/5	6/6	6/6	6/6	6/6	3/3	6/6	5/6	4/4	6/6	6/6	3/3	6/6

P: positivos; N: negativos; S/A: sem amostras; O: óbito.

Estatística: G1 \neq G2 ($p=0,0466$); G1 = G3 ($p>0,05$); G2 = G3 ($p=0,5040$) pelo teste de Log-Rank com dados censurados, considerando-se $\alpha=0,05$.

Tabela 11. . Resultado da PCR nas oito amostras teciduais coletadas após 21 dias de lactação, nas fêmeas de cada grupo. Botucatu, 2008

Animais	GRUPO 1								GRUPO 2								GRUPO 3							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Fêmea 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fêmea 2	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fêmea 3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fêmea 4	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fêmea 5	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fêmea 6	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

1 = Cérebro / 2 = Pulmão / 3 = Fígado / 4 = Coração / 5 = Diafragma / 6 = Língua / 7 = Musculatura Esquelética / 8 = Tecido mamário / N = Amostras negativas / P = Amostras positivas

Tabela 12. Resultado da PCR nas sete amostras teciduais coletadas após 21 dias de vida, nos seis filhotes de cada fêmea do G1. Botucatu, 2008.

Fêmea	Filhote 1							Filhote 2							Filhote 3							Filhote 4							Filhote 5							Filhote 6						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

1 = Cérebro; 2 = Pulmão; 3 = Fígado; 4 = Coração; 5 = Diafragma; 6 = Língua; 7 = Musculatura esquelética; N = Amostras negativas; P = Amostras positivas

6. Discussão

6.1. Animais experimentais

Em pesquisas experimentais com *Toxoplasma gondii*, os ratos (*Rattus norvegicus*) são considerados bons modelos biológicos, por serem mais resistentes ao desenvolvimento da enfermidade clínica (DUBEY e FRENKEL, 1998), entretanto, esta espécie não é resistente à infecção, podendo desenvolver a doença clínica e morrer pelas lesões parasitárias, dependendo principalmente do estado imunológico do animal.

Não foram observadas alterações clínicas dignas de nota, tanto nas mães inoculadas como em suas respectivas crias nos G1 e G3, corroborando com Mandakhalikar et al. (1994), que também não registraram nenhuma alteração clínica, apesar do encontro de cistos cerebrais, necrose hepática, renal, esplênica e congestão pulmonar. Diferentemente do G2, grupo submetido à imunossupressão, observaram-se principalmente alterações clínicas compatíveis com a toxoplasmose, embora o exsudato peritoneal destes animais, tenha sido negativo. A PCR positiva em amostras de musculatura esquelética, em ratas sobreviventes do G2 caracterizou assim a forma crônica da doença, e possivelmente a não recrudescência da enfermidade. O *imprint* do fígado e pulmão de três ratas que morreram deste grupo, revelaram achados compatíveis a um processo inflamatório, que pode ter aparecido a partir da queda de imunidade devido a uma infecção oportunista secundária.

Chinchilla et al. (1981), sugerem como dose letal para toxoplasmose em ratos 10^8 parasitos, independente da idade do animal. No entanto, De Champs et al. (1998) verificando o efeito da idade e da dose infectante na sobrevivência de ratos Wistar e Fischer inoculados com a cepa RH, observaram que a resistência ao *T. gondii* conferida aos ratos, esta relacionada à idade do animal, sendo que os neonatos são mais susceptíveis, e os desmamados resistentes.

Dubey (1996a) inoculou ratas Sprague-Dawley de 44 dias de idade com doses variando entre 10^0 a 10^7 oocistos da cepa VEG, considerada de baixa virulência para camundongos e classificada como genótipo III. Os animais inoculados com 10^5 a 10^6 oocistos, adoeceram apresentando diarreia e depressão. Três de cinco ratas inoculadas com 10^6 oocistos morreram no 8º dpi, enquanto todos os outros animais permaneceram sadios. Os animais doentes apresentaram lesões e taquizoítos em intestino, linfonodos mesentéricos, fígado, baço, coração, adrenais, linfonodos renais, língua, musculatura e cérebro. Em geral, as infecções com oocistos são mais severas nos hospedeiros intermediários do que aquelas induzidas com cistos (DUBEY e BEATTIE, 1988).

Portanto, a infecção dos ratos pelo *T. gondii*, e as taxas de mortalidade, estão relacionadas à quantidade de parasitos inoculados, bem como estágio infectante. No presente trabalho, utilizou-se somente uma única dose, 10^4 bradizoítos, estando abaixo das consideradas letais na literatura. Cabe ressaltar, que a resposta dos ratos não é homogênea, com grande influência da constituição genética dos animais à resposta ao *T. gondii* (FUJII et al. 1983 e KEMPF et al., 1999). Outro trabalho que aponta esta diferença genética é de Paulino e Vitor (1999), onde em infecção experimental a ocorrência da enfermidade congênita foi maior nas fêmeas Wistar do que nas Holtzman.

O modelo experimental mais utilizado para se avaliar a imunodepressão e conseqüentemente a recrudescência da infecção toxoplásmica é o camundongo. No presente estudo, trabalhou-se com ratas da linhagem Wistar, utilizando-se o protocolo de Djurkovic-Djakovic e Milenkovic (2001), adaptando à dose para inoculação subcutânea e para espécie utilizada. O trabalho destes pesquisadores avaliou a utilização somente da dexametasona e desta associada com acetato de cortisona, induzindo uma significativa imunodepressão e conseqüente reativação do parasito nos animais infectados. O maior efeito ocorreu quando as drogas foram associadas, porém a utilização prolongada causava considerável toxicidade e morte dos animais. Como no presente estudo, não se desejava a morte dos animais, optou-se por utilizar somente a dexametasona. A glicocorticoterapia utilizada como protocolo

de imunossupressão, requer cuidados pelos riscos de efeitos adversos, tanto nas lactantes como nos lactentes.

Segundo Hale (2006), os medicamentos são classificados em categorias de risco para uso na lactação. Os de nível 1 são os mais seguros, enquanto que os de nível 5 são contra-indicados. Os níveis 2, 3 e 4 são considerados, respectivamente, seguros, moderadamente seguros e possivelmente perigosos. A dexametasona é considerada como nível 3.

A dexametasona é um análogo sintético da prednisolona, e é 30 vezes mais potente que a hidrocortisona (ANDRADE, 2002). A vida média desta droga na circulação é relativamente longa, de 36 a 72 horas (FANTUZZI, et al., 1994), e segundo Lopes (2004), a concentração de 0,75mg/kg/diária, garante níveis constantes desta substância. É preconizada para terapias sistêmicas anti-inflamatórias e ou imunossupressivas agudas (ANDRADE, 2002)

A escolha da via de administração de uma droga é determinada por suas propriedades físicas e químicas, pelo local de ação e rapidez desejada (GOODMAN e GILMAN, 1987). Considerando-se estes aspectos utilizou-se somente a dexametasona, na imunossupressão. Optou-se por substituir a via oral de aplicação da dexametasona, utilizada por Djurkovic-Djakovic e Milenkovic (2001), pela via subcutânea, para minimizar algumas desvantagens como: irritação da mucosa gastrointestinal, destruição da droga por ação de enzimas digestivas ou pelo baixo pH gástrico, irregularidade na absorção ou propulsão de alimentos (GOODMAN e GILMAN, 1987), e ainda para quantificar a dose exata administrada já que no protocolo original, o medicamento era administrado na água de bebida dos animais.

Os fármacos são excretados mais facilmente para o leite materno durante os primeiros dias de lactação (colostró), pois as células alveolares são pequenas e o espaço intercelular é maior. Fatores que reduzem a capacidade da mãe em metabolizar ou excretar o fármaco podem aumentar a exposição do lactente ao mesmo (HOWARD e LAWRENCE, 1999).

A presença do fármaco no leite materno depende das seguintes características da droga: peso molecular; lipossolubilidade; capacidade de ligação às proteínas; grau de ionização; meia-vida de eliminação; biodisponibilidade e concentração plasmática materna. Sua passagem entre o plasma e o leite é bidirecional. Quando a concentração do fármaco livre, não ionizado, no leite é mais elevada que a existente no plasma, ocorre sua transferência para o plasma. Assim, ordenhar e descartar o leite não acelera de forma efetiva a eliminação da maioria dos medicamentos excretados no leite (CHAVES e LAMOUNIER, 2004). O pH do leite é menor que o pH do plasma, esta diferença auxilia na excreção do fármaco no leite. Além desta afinidade, a dexametasona é lipossolúvel o que também, facilita sua excreção pelo leite, já que o mesmo é rico em gordura (BERNARDI, 2002).

Sugere-se que a causa da morte das ratas imunossuprimidas e de todas as ninhadas, à ação prolongada da dexametasona. Esta por sua vez, afeta o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal, resultando na redução da produção de anticorpos e queda da imunidade (ANDRADE, 2002). Nos neonatos, a morte ocorreu possivelmente pela alta concentração da droga no leite, e baixa capacidade de biotransformá-la, pela imaturidade do sistema enzimático (BERNARDI, 2002).

6.2. Exames Realizados

6.2.1. Provas Sorológicas

Tradicionalmente a sorologia para *T. gondii* é o método mais utilizado para o diagnóstico, devido às limitações e dificuldades inerentes às técnicas parasitológicas. Geralmente a pesquisa sorológica baseia-se na busca de IgG específica. Os títulos podem permanecer altos por anos e a infecção recente requer a verificação de aumento contínuo, e se faz necessário à avaliação sorológica pareada (SPARKES, 1998).

Dubey e Frenkel (1998), apontaram que nenhum dos testes disponíveis para avaliação de anticorpos anti-*T. gondii* em ratos foi

devidamente avaliado para a infecção latente nesta espécie. Para a maioria dos hospedeiros estudados, títulos de anticorpos de 64 ao teste de aglutinação ao látex (LAT) e a hemaglutinação indireta (HAI), de 16 para o teste de Sabin-Feldman (SF) e para imunofluorescência indireta (RIFI) e de 25 para o método de aglutinação direta (MAD), são considerados específicos. Por outro lado, nenhum destes testes é definitivo, pois o parasito já foi isolado de ratos e de seres humanos soronegativos, e em alguns casos não foi reisolado mesmo em ratos com altos títulos de anticorpos, semelhantemente observado neste estudo.

Alguns trabalhos avaliaram a dinâmica de anticorpos na infecção toxoplásmica em ratos, utilizando cepas de virulência diferentes e testes distintos. Lundes e Jacobs (1963) utilizaram a prova HAI, para ratos inoculados via intraperitoneal com 10^4 taquizoítos da cepa RH e com a cepa 113-CE, observando soroconversão a partir da terceira e décima semana respectivamente. No presente trabalho, utilizou-se uma única cepa avaliando dinâmica de anticorpos entre os diferentes grupos experimentais e diferentes testes empregados. A maioria dos animais inoculados soroconverteram e tiveram títulos máximos quatro semanas pós inoculação, permanecendo até o final do experimento, corroborando com Sparkes (1998).

Na sorologia pelo teste de SF, os ratos desenvolvem altos títulos, variando com a cepa e estágio infectante do parasito inoculado. Em ratos inoculados via intraperitoneal com mais de 10^4 taquizoítos da cepa RH, foram detectados anticorpos entre o terceiro e quinto dpi, com pico de título entre 4000 a 16000 nove dpi (LUNDES e JACOBS, 1963). Henry e Beverley (1977), inocularam ratos de 300g com 100 cistos teciduais pela via subcutânea, com cepa de *T. gondii* de baixa virulência para camundongos. Ao teste de SF eles ainda estavam negativos nove dpi, apresentando título máximo de 220, 23dpi.

Dubey (1996a), inoculou ratas Sprague-Dawley de 44 dias de idade com oocistos esporulados da cepa VEG, genótipo III e virulenta para camundongos. Anticorpos foram detectados por todos os testes de aglutinação utilizados, mas os títulos pela MAD foram mais elevados, entre 16000 a 32000, que os encontrados nos testes de HA ou LAT. De Champs et al. (1998), verificaram soroconversão pela MAD em ratos Fisher de cinco semanas de idade, inoculados com 10^7 taquizoitos da cepa RH, e em ratos Wistar de sete a 46 dias de idade, inoculados com 10^2 , 10^4 ou 10^8 taquizoitos da cepa RH. Todos os animais apresentaram título 4000 cinco semanas pós inoculação.

Calderón e Thiermann (1973), encontraram diferenças na curva sorológica de ratos inoculados com cepas de *T.gondii* de diferentes virulências para camundongos. A curva sorológica obtida nos animais inoculados com a cepa RH, virulenta para camundongos, iniciou mais precocemente e elevou-se mais rapidamente do que aquela verificada nos ratos inoculados com a cepa ALT, pouco virulenta para camundongos, sendo que a partir do 56^o dia após a infecção as curvas se estabilizaram e praticamente se igualaram. No presente estudo verificou-se que a cepa BTU4 altamente virulenta para camundongos, apresentou um elevado nível de anticorpos anti-*T. gondii* atingindo o pico 30dpi estabilizando-se a partir dos 45dpi.

Dubey et al. (1995), assinalam que os títulos sorológicos obtidos pela MAD normalmente são mais elevados que os encontrados no teste de SF, e que normalmente é mais sensível que os outros testes de aglutinação. Da mesma forma, no presente estudo encontrou-se resultados semelhantes quando se compara a MAD com a RIFI, sendo a MAD um teste mais sensível.

A sensibilidade da MAD é atribuída pela interação somente de antígeno-anticorpo, detectando apenas IgG, pois o 2ME inativa IgM e outros tipos de imunoglobulinas (WILSON et al., 1990). Técnica descrita primeiramente por Fulton (1965) e adaptada por Desmonts e Remington (1980), tornou-se um diagnóstico prático, de baixo custo, menos laborioso e pode ser utilizado para a pesquisa de anticorpos em qualquer espécie animal, pois necessita de conjugado espécie-específico, nem imunoglobulina-

específica, porém há necessidade de padronização da técnica para evitar o risco de resultados falso-positivos e ou falso-negativos.

Na infecção toxoplásmica, a IgG pode permanecer por anos detectável nos soros dos pacientes infectados, o 2ME, utilizado na MAD, auxilia no diagnóstico sorológico da toxoplasmose, contribuindo para o aumento da especificidade da prova, mantendo-se a alta sensibilidade da mesma (DESMONTS e REMINGTON, 1980). O 2ME atua sobre a IgM, especificamente em sua estrutura pentâmera, nas pontes dissulfídicas, na cadeia J, reduzindo-as e degradando-as em cinco subunidades não aglutinantes, destruindo assim esta imunoglobulina, tornado-se afuncional (FERRI et al, 1977).

Outros autores, apontam diferenças entre a MAD e RIFI, analisando soro de outras espécies animais. SEEFELDT et al. (1989) obtiveram no exame de 377 fluidos torácicos de fetos abortados de ovinos, 62% e 67% de positividade à RIFI e MAD, respectivamente, com 86% de correlação entre as duas provas. Examinando-se 2306 amostras de soros de ovinos adultos na Espanha, MARCA et al. (1996), encontraram 33,72% de reagentes à RIFI e 35,27% de reagentes ao MAD.

SACCO et al. (1979) registraram em cães a freqüência de positividade de 35,2% e 40,3% no exame de 233 amostras de soro pela RIFI e MAD, respectivamente, e em gatos, 46,7% na RIFI e 66,7% na MAD. ABATE et al. (1989) em Torino, Itália, examinado 85 soros de cães, encontraram 35,29% de reagentes na RIFI e 31,77% na MAD, e em amostras de gatos, registraram a freqüência de anticorpos de 39,78% na RIFI e 26,88% na MAD. Em contrapartida, Ljungström et al. (1994), demonstraram concordância perfeita entre os resultados obtidos na RIFI e na MAD, no exame de 58 amostras de soros ovinos, com 31 (53,44%) positivas em ambos os testes.

Como verificado em vários trabalhos, em diferentes espécies, e também neste estudo, a MAD resultou em maior número de animais positivos, com títulos ligeiramente mais altos observando assim maior sensibilidade quando comparada com a RIFI. Para o G1, não se observou diferença

estatisticamente significativa entre a MAD e a RIFI, apenas no momento de pico de produção de anticorpos (30dpi). No G2 observou-se diferença significativa estatística entre os testes sorológicos, próximo à parição (75dpi) e após parição (90dpi), e, os animais estavam sendo submetidos ao tratamento de imunossupressão. No G3, houve apenas dois momentos de avaliação sorológica, com diferença estatisticamente significativa entre os testes sorológicos, entretanto nem todos os animais soroconverteram, fato que pode ser explicado pelo curto período de infecção, pela via de inoculação e pela dose infectante, como mencionado anteriormente. Quando se compara cada teste, em cada momento, entre os animais dos três grupos, não há diferença estatística significativa. Dubey et al. (1985) sugerem que os diferentes resultados devem estar relacionados com diferentes subtipos de IgG detectadas nos testes sorológicos. Considerando-se os achados deste trabalho, sugere-se que os subtipos de imunoglobulinas IgG possam estar relacionados com o tempo de infecção do animal.

Para os resultados dos exames sorológicos dos filhotes, ocorreram diferenças estatísticas significativas tanto na RIFI como na MAD quando comparam-se os filhotes do G1 x G3. No primeiro grupo as mães foram crônicas, e no terceiro, as mesmas foram submetidas à forma aguda da infecção. Este fato, pode ser explicado também pelo curto período de infecção nas mães do G3. O tipo de placenta hemocorial destes animais, semelhantemente a da mulher, possibilita o contato do sangue materno com o trofoblasto, permitindo assim a troca de nutrientes como também de imunoglobulinas. Ocorre a transferência de IgG materna para o feto, e desta forma o recém nascido ou filhote podem apresentar níveis circulantes de IgG comparáveis aos da mãe (TIZARD, 2002). Isto pode explicar porque os filhotes das ratas do G1 apresentaram níveis de anticorpos mais elevados e em maior proporção do que os filhotes das fêmeas do G3. Além disso, a imunoglobulina predominante no colostro da maioria dos animais domésticos é a IgG, que podem corresponder por 65 a 90% do seu total de anticorpos. A IgA e outras são geralmente componentes menores, porém importantes.

Outro aspecto a ser considerado, é a resposta do filhote frente ao parasito, pois este foi encontrado também pela PCR no leite de uma das fêmeas tanto no G1 como no G3. Para os filhotes do G3 sugere-se que a soroconversão, em quatro dos seis filhotes da ninhada foi devido ao leite, pois o mesmo foi positivo na PCR, demonstrando a eliminação de *T. gondii*.

A identificação dos níveis de anticorpos anti-*T.gondii* é importante principalmente nos casos de gestantes e pacientes imunocomprometidos como relata a literatura. Em gestantes, a transmissão vertical pode levar a morte fetal ou a lesões irreversíveis na criança. Em imunocomprometidos ausência de imunidade celular interfere na resposta humoral contra o agente, levando alterações clínicas e normalmente a infecções oportunistas secundárias (TENTER, 2000). No presente estudo, avaliou-se a infecção crônica, a recrudescência e a primoinfecção, utilizando-se as ferramentas diagnósticas sorológicas, a RIFI e MAD, obtendo resultados satisfatórios em ambas as provas. Com estes resultados pode-se sugerir a utilização da MAD, extrapolando o diagnóstico principalmente para gestantes, facilitando assim a vigilância da toxoplasmose neste grupo. Entretanto, a introdução de novos testes na rotina de serviço, deve ser cautelosa e testada rigorosamente.

6.2.2. Citologia

A literatura pesquisada, mostra a utilização desta técnica, principalmente para avaliar a presença do parasito em tecidos dos animais. Berengo, et al. (1969) relatam a ausência de *T. gondii* ao exame direto de macerados de cérebros de raposas, gatos e coelhos, assim como diafragma de suínos sororeagentes para o parasito pelo teste de Sabin-Feldman.

Há inúmeras técnicas de coloração, entre elas a de Giemsa, que foi utilizada neste estudo para avaliar a presença das formas parasitárias do *T. gondii* no tecido mamário e no leite das ratas infectadas. Nas glândulas mamárias não houve evidências da presença de formas parasitárias taquizoíticas do agente. Já no leite foram encontradas formas sugestivas de *T. gondii* em 34,34% das amostras, com maior frequência na primeira coleta de

todos os animais, diminuindo com o passar das coletas. Encontrou-se também formas taquizoíticas *T. gondii* no leite materno humano, corado por Giemsa, em um caso de surto de toxoplasmose ocorrido em Santa Vitória do Palmar-RS (BRASIL, 2006).

Jacobs et al. (1960), estudando a prevalência da toxoplasmose em 86 ovinos, isolaram o parasito em apenas 8 (9,3%) deles. Em 97,7% dos casos encontraram *Sarcocystis* sp. Cremers et al. (1991), examinando 40 amostras de tecidos de ovinos corados por Giemsa, não detectaram *T.gondii* em nenhum deles, mesmo em animais sororeagentes ao ensaio imunoenzimático, entretanto observaram a presença de bradizoítos de *Sarcocystis* sp em 70% das amostras.

Devido às dificuldades nesta prova e também pela sua baixa especificidade, ela é pouco utilizada com fins diagnósticos. No presente estudo, apesar de não ter se trabalhado com órgãos, encontrou-se também dificuldade para análise do leite, pela alta taxa de gordura neste tipo de material, dificultando assim o diagnóstico fidedigno, pois tanto nos controles negativos foi difícil à análise das amostras pela coloração de Giemsa. Desta forma optou-se em denominar os achados, como formas taquizoíticas sugestivas de *T. gondii*.

6.2.3. Inoculação em camundongos - Bioprova

Os estudos realizados utilizando este tipo de diagnóstico, em sua maioria avaliam amostras individuais do tecido de cada animal. Dubey (1997), detectou o parasito em vários órgãos de ratas Sprague-Dawley adultas inoculadas com oocistos das cepas VEG, de baixa virulência, genótipo III e GT-1, de alta virulência, genótipo I. Avaliou-se a manutenção do parasito nos órgãos dos animais inoculando em camundongos amostras de estomago, olhos, pulmão, cérebro, rim, útero, língua, baço, coração e linfonodos. Aos 76dpi de um oocisto da cepa VEG, foram encontrados cistos no cérebro, músculos, pulmões e rins. Aos 240 dpi de 10^5 oocistos da cepa VEG, foram encontrados cistos no cérebro, musculatura, coração, língua, olhos, pulmão, rins, linfonodos e intestino. Aos 443 dpi de 10^5 oocistos de cepa GT-1, foram

encontrados cistos no cérebro músculos, coração, língua, pulmões, fígado, baço, rim, útero, intestino e estômago. A recuperação do parasito de órgãos não neurais evidência a importância dos ratos como fontes de infecção para outras espécies. Apesar da virulência da cepa utilizada, o parasito foi encontrado na musculatura dos animais infectados, corroborando com achados referentes à PCR no presente estudo.

Da Silva (2003), observou que quatro ratos inoculados com dois cistos da cepa ME49, apresentaram cistos a microscopia e um permaneceu negativo, mesmo quando realizada a passagem cega de material em camundongos. Resposta semelhante foi obtida em animais inoculados com 20 cistos teciduais. Já nos seis animais inoculados com 1000 cistos da cepa ME49, em nenhum dos casos foram encontrados cistos cerebrais, e, em três casos os camundongos se infectaram após a inoculação de material cerebral proveniente dos ratos.

Dubey et al. (1995), realizando bioensaios em camundongos, verificaram que o número de parasitos teciduais é baixo. Para obtenção de maior concentração de *T. gondii* no inoculo, os tecidos devem ser digeridos pela ação de enzimas como a pepsina. No presente estudo encontrou-se soroconversão nos camundongos inoculados tanto com material digerido pela pepsina como *in natura*.

Outro fato, que contribui para o êxito do isolamento de *T. gondii* relaciona-se ao número de camundongos inoculados, além da quantidade de tecido utilizada e a concentração do parasito nas amostras teciduais (DUBEY, et al. 2005). Da Silva e Langoni (2001), utilizaram para cada amostra de tecido oito camundongos, sendo quatro inoculados com amostras *in natura* e quatro com amostras digerida pela pepsina, obtendo 85% de isolamento das amostras de tecido ovino. Ragozo (2007), isolou o parasito em 19,5% das amostras de tecido ovino, porém utilizou *pool* de cérebro e coração, e outro *pool* de masseter e diafragma, inoculando de cinco a dez camundongos por amostra.

Yai (2007), preferiu também a inoculação em *pool* de tecidos em camundongos, elegendo tecidos de capivara que apresentavam

provavelmente, alta concentração de cistos (cérebro, coração e língua), considerando-se o grande número de isolamentos, cerca de 90%. Utilizando técnica semelhante, índices de 25%, 66,2% e 41,7% foram obtidos respectivamente de suínos (SANTOS, et al., 2005), gatos (PENA et. al., 2006) e cães (DUBEY et al., 2007).

Optou-se no presente estudo pela inoculação de amostras em *pool* de tecidos, pelo grande número tanto de amostras como da utilização de animais experimentais (camundongos). Estabeleceu-se como prova ouro a PCR, já que a mesma avaliou os tecidos individualmente. Não foi detectada a presença do parasito pela soroconversão dos camundongos inoculados com o *pool* de amostras na maioria dos animais. Acredita que isto aconteceu quando agrupou-se os tecidos, diluindo-se assim as amostras, e diminuindo a concentração de *T. gondii* presente, fato que provavelmente tenha também ocorrido no trabalho de Ragozo (2007).

6.2.4. PCR

Burg et al. (1989), descreveram a utilização da PCR para o gene B1 na detecção específica de *Toxoplasma gondii*, recomendando-os para aumentar a especificidade da prova, protocolos para detecção da seqüência por hibridização com sondas internas, ou reações do tipo *nested*-PCR.

O gene B1, até o presente momento é o mais utilizado em procedimentos biomoleculares no diagnóstico da toxoplasmose. O limiar de detecção na PCR para esta seqüência varia de 64 a 100 parasitos (JOSS et al. 1993), apesar de Franzen et al. (1997), apontarem o limite de detecção de 20 parasitos em 100µL de sangue. Nos protocolos de PCR utilizando a hibridização do produto amplificado com sondas, este limite é reduzido para 0,045 a um parasito em suspensão em tampão, e 10 ou 100 parasitos na presença de leucócitos e amostras de sangue, respectivamente (BURG et al. 1989). Já a *nested*-PCR para o gene B1 é capaz de detectar de um a 10 parasitos de acordo com Joss et al. (1993), Cingolani et al.(1996) e Lappin et al. (1996). Burg et al. (1989), apontaram a especificidade desta seqüência já que a sonda específica para o gene B1 não hibridizou com DNA proveniente de

Sarcocystis, *Neospora*, *Plasmodium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Absídia*.

Diversos oligonucleotídeos e condições de reação foram testados para identificar a sensibilidade e especificidade da amplificação do *T. gondii*, diferenciando o mesmo de quatro espécies de *Sarcocystis* de ovinos. Utilizando altas condições de estringência, a sensibilidade destes oligonucleotídeos foi de 0,1ng de DNA de *T. gondii*, correspondendo em torno de 1000 parasitos. Diminuindo a estringência da reação, pela utilização de concentrações de cloreto de magnésio $\geq 1,5\text{mM}$ e 36 ciclos de amplificação resultaram em sensibilidade 100 vezes maior que as observadas anteriormente, mas neste caso não foi possível distinguir as espécies de *Sarcocystis*, estudadas (TENTER et al., 2000). No presente estudo, utilizou-se a concentração de cloreto de magnésio 1,5mM e 35 ciclos de reação, colaborando assim para maior sensibilidade. Neste caso, como a infecção fora experimental com controle e conhecimento da origem dos animais inoculados, livres de quaisquer outros parasitos que poderiam interferir no resultado da prova, admiti-se veracidade dos resultados positivos para *T. gondii*.

Wastling et al. (1993), demonstraram que um dos fatores limitantes para o sucesso da técnica de PCR é a escolha do oligonucleotídeo utilizado para iniciação da reação em cadeia. Com amostras de sangue coletadas em diferentes dias após a infecção experimental de ovinos com a cepa S48 de *T.gondii*, pôde-se determinar os oligonucleotídeos para identificar o gene de SAG-1 observando duas vezes mais resultados falso-positivos quando comparados com os oligonucleotídeos para o gene B1, e também a detecção precocemente neste com três dias pós infecção, enquanto a PCR-SAG-1 só detectou os parasitos no sétimo, e o ensaio imunoenzimático com o soro dos camundongos inoculados com sangue dos ovinos só detectou anticorpos nas amostras obtidas a partir do 11º dia pós infecção.

No presente estudo detectou-se 66,66% de positividade na PCR, em amostras de tecido estriado esquelético, nos três grupos experimentais inoculados com 10^4 de bradizoítos da cepa BTU4. Os animais não apresentaram positividade nos demais tecidos pesquisados. O filhote 3 da

fêmea 1 do G1, apresentou amostras positivas de fígado e musculatura esquelética, bem como o filhote 5, positividade somente no tecido hepático. Neste mesmo grupo, a rata 2 teve um filhote com pulmão positivo, sugerindo a transmissão do *T. gondii*. Os resultados reforçam a hipótese da transmissão materna da toxoplasmose pelo leite neste grupo, já que, duas amostras de leite da fêmea 1 (1^a e 5^a coletas) foram positivas na PCR. Também detectou-se uma amostra (1^a coleta) positiva para a fêmea 3 do G3. Ruchman e Fowler (1951), detectaram o parasito no sangue de ratos inoculados pela via intraperitoneal com taquizoítos da cepa RH, a partir de quatro horas após a inoculação e até o 16^o dia. Este fato, corrobora com os dados do trabalho, pois revela a presença do parasito na corrente sanguínea, principalmente no grupo com inoculação após o parto, pois a circulação do sangue é mais intensa para auxiliar na produção de leite.

7. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que:

1. Ocorreu a eliminação de *T. gondii* pelo leite de ratas cronicadas (G1), bem como, de ratas primoinfectadas (G3);
2. Ocorreu a transmissão galactogênica para os neonatos pertencentes a rata 1 do G1, já que tanto o leite desta fêmea como amostras de tecidos dos neonatos mostraram-se positivas na PCR;
3. A sensibilidade do método de aglutinação direta (MAD) foi maior que da imunofluorescência indireta (RIFI), para detecção de anticorpos IgG, nas condições do presente estudo;
4. A produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi maior em filhotes provenientes de ratas infectadas cronicamente;
5. Tanto as ratas do G1 e G3, como dos seus respectivos filhotes não apresentaram sintomatologia clínica compatível com a toxoplasmose, exceto nas ratas do G2 e em seus neonatos que morreram todos;
6. A imunossupressão utilizando a dexametasona na dose 2,5 mg/kg/dia via subcutânea, durante 15 dias consecutivos em ratas lactantes, ocasionou a morte em 50% das ratas inoculadas e todos os neonatos;
7. Observou-se o DNA do parasito em amostras de tecido muscular esquelético tanto das ratas de G1 como de G2, com maior frequência nos animais do G1; e apenas em amostras de fígado, tecido muscular esquelético e pulmão de filhotes do G1.

8. REFERÊNCIAS[†]

ABATE, O.; GASBARRA, S.; DOTTA, U. Toxoplasmosi: indagine sul titolo anticorpale in cani e in gatti sani e portatori di patologie. **Veterinaria Cremona**, v.3, p.19-24, 1989.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. Washington: Pan American Health Organization, 2003. v.3, p.88 - 98.

ANDRADE, M.M.J. Antiinflamatórios esteroidais. In: _____ SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, L.S.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.242-250.

ARAÚJO, W.N.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Toxoplasmose: uma zoonose – realidades e riscos. **Cães e Gatos**, v.79, p.21-27, 1998.

ARIAS, M.L.; REYES, L.; CHINCHILLA, M.; LINDER, E. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in meat producing animals in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v.42, p.15-20, 1994.

BERENGO, A.; LALLA, F.; CAVAALLINI-SAMPIERI, L.; BECHELLI, G.; CAVALLINI, F. Prevalence of toxoplasmosis among domestic and wild animals in the area of Siena, Italy. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.18, p.391-394, 1969.

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, L.S.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.691-699.

[†] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador, 2005. 28p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Surto Intra Familiar de Toxoplasmose, Santa Vitória do Palmar-Rs, Julho de 2005. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.6, n.3, p.2-7, 2006.

BROWN, R.E. Hormônios e comportamento parental. In: COSTA, M.J.R.P.; CROMBERG, V.U. (Eds.). **Comportamento materno em mamíferos: bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Etologia, 1998. p.53-99.

BURG, J.K.; GROVER, C.M.; PULLEY, P.; BOOTHROYD, J.C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.8, p.1787-1792, 1989.

CALDERÓN, C.; THIERMANN, E. Evolución de la infección experimental por *Toxoplasma gondii* em ratas inoculadas com dos cepas de diferente virulência. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.28, p.10-14, 1973.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, p.143-71. 1964.

CAMARGO NETO E.; ANELE, E.; RUBIM, R.; BRITES, A.; SCHULTE, J.; BECKER, D.; TUUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **International Journal of Epidemiology**, v.29, n.5, p.941-947, 2000.

CANTOS, G.A.; PRANDO, M.D.; SIQUEIRA, M.V.; TEIXEIRA, R.M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p.335-341. 2000.

CHAVES, R.G.; LAMOUNIER, J.A. Uso de medicamento durante a lactação. **Jornal de Pediatria**, v.80, n.5, p.189-198, 2004.

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

CHIARI, C.A.; LIMA, W.S.; LIMA, J.D.; ANTUNES, C.M.F. Soro-epidemiologia da toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, p.587-609, 1987.

CHINCHILLA, M.; ALFARO, M.; GUERRERO, O.M. Adaptación natural de rata blanca a *Toxoplasma gondii*. **Revista de Biología Tropical**, v. 29, p.472-476, 1981.

CINGOLANI, A.; DE LUCA, A.; AMMASSARI, A.; MURRI, R.; LINZALONE, A.; GRILLO, R.; ANTINORI, A. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-relates focal brain lesions. **Journal of Medical Microbiology**, v.45, p.472-476, 1996.

CREMERS, H.J.W.M.; VAN KNAPEN, F.; PANGGABEAN, S.O.; DEN HARTOG, J.M.P. Problems in detecting *Toxoplasma gondii* in the muscular tissues of sheep. **Tijdschrift voor Dierge Neeskund**, v. 116, p.3-6, 1991.

DA SILVA, A.V. **Avaliação da infecção de ratos Fisher com duas amostras geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*: cinética de anticorpos, reisolamento em camundongos e reação pela cadeia em polimerase**. 2003. 146p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopatology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v.97, n.3, p.199-207. 2001.

DARDÉ, M.L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v.78, n.5, p.786-794, 1992.

- DE CHAMPS, C.; PELLOUX, H.; DECHELOTTE, P.; GIRAUD, J.C.; BALLY, N.; AMBROISE-TOMAS, P. *Toxoplasma gondii* infection in rats by the RH strain: Inoculum and age effects. **Parasite**, v.5, p.215-218, 1998.
- DENKERS, E.Y., GAZZINELLI, R.T. Regulation and function of T cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.569-588. 1998.
- DEROUIN, F.; LACROIX, C.; SUMYUEN, M.H.; ROMAND, S.; GARIN, Y.J.F. Modèles expérimentaux de toxoplasmose: applications pharmacologique. **Parasite**, v.2, p.243-256, 1995.
- DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, p.562, 1980.
- DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; THULLIEZ, P. Toxoplasmose congénitale: cinq cas de transmission à l'enfant d'une infection maternelle antérieure à la grossesse. **Presse Medicines**, v.19, p. 1445-1449. 1990.
- DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; MILENKOVIC, V. Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. **Acta Protozoologica**, v.40, p. 99-106, 2001.
- DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: Academic, 1988. 315p.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.205, n.11, p.1593-1598. 1994.
- DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v.64, p.65-70, 1996.
- DUBEY, J.P. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. **Journal of Parasitology**, v.82, p.951-956, 1996a.
- DUBEY, J.P. Distribution of tissue cysts in the organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 755-757, 1997.

DUBEY, J.P. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradizoites in rats and mice. **Journal of Parasitology**, v.84, p.1279-1282,1998.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v.74, n.1, p.75-77,1998a.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Veterinary Parasitology**, v.77, p.1 -32, 1998.

DUBEY, J.P.; THULIEZ, P.; POWELL, E.C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* in mice and cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, n.1, p. 48-53, 1995.

DUBEY, J.P.; DESMONTS, G.; MCDONALD, C.; WALLS, K.W. Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma gondii*: Comparison of Sabin-Feldman dye test and other agglutination tests. **American Journal Veterinary Research**, v.46, p.1085-1088, 1985.

DUBEY, J.P., SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MENERVINO, A.H.; FARIAS, N.A.; RUAS, J.L.; SANTOS, T.R.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK, O.C.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.2, p.182-188, 2007.

DUBEY, J.P.; KARHEMERE, S.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; DIABATE, A.; DABIRE, K.R.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.; LEHMANN, T. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso and Kenya). **Journal Parasitology**, v.91, n.1, p.62-72, 2005.

ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v.28, n.7, p.1053-1060, 1998.

- FANTUZZI, G.; DEMITRI, M.T.; GHEZZI, P. Differential effect of glucocorticoids on tumour necrosis factor production in mice: up-regulation by early pretreatment with dexamethasone. **Clinical and Experimental Immunology**, v.96, p.166-169, 1994.
- FERREIRA, M.S. Infectious by protozoa in immunocompromised hosts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.159-162, 2000.
- FERRI, R.G.; CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. **Imunologia**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1977. 316p.
- FRANZEN, C.; ALTFELD, J.A.; HEGENER, P.; HARTMANN, P.; ARENDT, G.; JABLONOWSKI, H.; ROCKSTROH, J.; DIEHL, V.; SALZBERGER, B.; FATKENHEUER, G. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood for human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2639-2644, 1997.
- FRENKEL, J.K. *Toxoplasma* in and around us. **Bioscience**. v.23, p.343-352. 1973.
- FRENKEL, J.K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v.4, p.273-278, 1988.
- FRENKEL, J.K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Eds). **Tratado de Infectologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. p.1290-1305.
- FULTON, J.D. Micro-agglutination test for *Toxoplasma* antibodies. **Immunology**, v.9, p.491-495, 1965.
- FUJII, H.; KAMIYAMA, T.; HAGIWARA, T. Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory rodents. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v.36, p.343-346, 1983.
- GAZZINELLI, R.T.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactive chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v.149, p. 175-180, 1992.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. 1195p.

GUIMARÃES, A.C.S.; KAWARABAY, M.; BORGES, M.M.; TOLEZANO, J.E.; ANDRADE JÚNIOR, H.F. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in Sao Paulo metropolitan region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p.479-483. 1993.

HAFID, J.; FLORI, P.; RABERIN, H.; SUNG, R.T.M. Comparison of PCR, capture ELISA and immunoblotting for detection of *Toxoplasma gondii* in effected mice. **Microbiology**, v.50, p.1100-1104, 2001.

HALE, T.W. **Medications and mothers' milk**. 12.ed. Amarillo: Pharmasoft Publ, 2006.1075p.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. Camundongo. In: _____ **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. São Paulo: Roca, 1993. p. 41-49.

HENRY, L.; BEVERLEY, J.K.A. *Toxoplasma* in rats and guinea-pis. **Journal of Comparative Pathology**, v.87, p. 97-102, 1977.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal of Parasitology**, v.30, n.1, p.69-75. 2000.

HOWARD, C.R.; LAWRENCE, R.A. Drugs during breastfeeding. **Clinics in Perinatology**, v.26, n. 2, p. 447-478, 1999.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal infectious Disease**, v.172, n.6, p.1561-1566, 1995.

HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F.; WORK, K. The faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v.74, n.3, p.462-464, 1968.

HUTCHINSON, W.M.; HAY, J.; LEE, W.R.; SLIIM, J.C. A study of cataract in murine congenital toxoplasmosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.76, n.1, p.53-70.1982.

INNES, E.A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.20, n.2, p.131-138, 1997.

JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lutea in eye of normal dimensions, and in microphthalmic eye, with parasites in the retina. **Casopis Lekaru Ceskych**, v.62, p.1021-1027, 1923.

JACOBS, L.; REMINGTON, J.S.; MELTON, M.L. A survey of meat sample for suine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. **Journal of Parasitology**, v. 46, p.23-26, 1960.

JENUM, P.A.; HOLBERG-PETERSEN, M.; MELBY, K.K.; STRAY-PEDERSEN B. Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples: the Norwegian experience. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.106, p.680-686, 1998.

JOHNSON, A.M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitology Today**, v.13, n.10, p.393-397, 1997.

JOSS, A.W.L.; CHATTERTON, J.M.W.; EVANS, R.; HO-YEN, D.O. *Toxoplasma* polymerase chain reaction on experimental blood samples. **Journal of Medical Microbiology**, v. 38, p.38-43, 1993.

KASPER, L.H.; BUZONI-GATEL, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v.14, p.150-161, 1998.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.163-172.

KEMPF, M.C.; CESBRON-DELAUW, M.F.; DESLEE D.; GROSS, U.; HERMANN, T.; SULTON, P. Different manifestations of *Toxoplasma gondii*

infection in F344 and LEW rats. **Medical Microbiology and Immunology**, v.187, p.137-142, 1999.

LAPPIN, M.R.; BURNEY, D.P.; DOW, S.W.; POTTER, T.A. Polymerase chain reaction of the detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor of cats. **American Journal Veterinary Research**, v.57, p.1589-1593, 1996.

LEITE, M.S.; AZEREDO, V.B.M.G.; CARMO, T., BOAVENTURA, G.T. Utilização da multimistura durante a lactação e seus efeitos na produção e composição do leite materno de ratas. **Revista de Nutrição**, v.15, n.2. p.211-221, 2002.

LJUNGSTRÖM, B.L.; LUNDÉN, A.; HÖGLUND, J.; ZAKRISSON, G. Evaluation of a direct agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cat, pig and sheep sera. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.35, p.213-216, 1994.

LOKE, Y.W. Transmission of parasites across the placenta. **Advances in Parasitology**, v.21 p.155-228, 1982.

LOPES, E.S.G. **Efeito da adrenalectomia na evolução da Doença de Chagas experimental em ratos Wistar machos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi***. 2004. 187p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LUNDES, M.N; JACOBS, L. Toxoplasma hemagglutination and dye test antibodies in experimentally infected rats. **Journal of Parasitology**, v.49, p.932-936, 1963.

MACEDO, V.O. Toxoplasmose. In: CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; RESENDE, J.M. **Protozooses humanas**. São Paulo: Fundação BYK, 1994. p. 153-170.

MAGALDI, C.; ELKIS, H.; PATTOLI, D.; QUIRÓZ, J.C.; COSCINA, A.L.; FERREIRA, J.M. Surto de toxoplasmose : Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 141-171, 1967.

MANDAKHLIKAR, M.V.; SHASTRI, U.V.; NARLADKAR, B.W.; MOREGAONKAR, S.D. Studies on oral infection of Parbhani isolate of *Toxoplasma* in mice and rats. **Indian Veterinary Journal**, v.71, p.1152-1154, 1994.

MARCA, M.C.; RAMOS, J.J.; LOSTE, A.; SAEZ, T.; SANZ, M.C. Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified direct agglutination test methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.99-103, 1996.

MORGAN, U.M. Detection and characterization of parasites causing emerging zoonosis. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.1407-1421, 2000.

MOURA, L.; OLIVEIRA, L.M.G.B.; WADA, M.Y.; JONES, J.L.; TUBOI, S.H.; CARMO, E.H.; RAMALHO, W.M.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R.M.T.; SILVA, A.J.; MOURA, I.; DUBEY, J.P.; GARRETT, O.D. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.2, p. 326-329. 2006.

NICOLLE. C. S.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (on organismes voisins), du *gondii*. **Comptes Rendus l'Academie des Sciences**, v.147, p.763-766, 1908.

PAUGAM, A.; DUPOUY-CAMET, J.; SUMEYEN, M.H.; ROMAND, S.; LAMORIL, J.; DEROUIN, F. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice. **Parasite**, v.2, n.2, p.181-184, 1995.

PAULINO, J.P.; VITOR, R.W. Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holtzman rats. **Parasite**, v.6, p.63-66, 1999.

PELLOUX, H.; WEISS, J.; SIMON, J., FRICKER-HIDALGO, H.; AMBROISE-THOMAS, P. A new PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Microbiological Methods**, v.27, p.97-107, 1996.

PENA, H.F.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii* infection cats from São Paulo state, Brazil. Seroprevalence,

oocyst shedding, isolation in mice, in biologic and molecular characterization. **Research Veterinary Science**, v.81, n.1, p.58-67, 2006.

PETTERSEN, E.R. Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.92, p.175-176, 1984.

PETERSEN, E.; POLLAK, A.; REITER-AWONA, I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. **International Journal of Epidemiology**, v.31, n.2, p.115-144, 2001.

PINKERTON, H.; WEINMAN, D. *Toxoplasma* infection in man. **Archives of Pathology**, v.30, p.374, 1940.

QUARRIE , L.H.; ADDEY, C.V.; WILDE, C.J. Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. **Journal of Cellular Physiology**, v.168, p.559-569, 1996.

RAGOZO, A.M. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em caprinos e ovinos**. 2007. 115p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, São Paulo.

REICHE, E.M.V.; MORIMOTO, H.K; FARIAS, G.N.; HISATSUGU, K.R.; GELLER, L.; GOMES, A.C.L.F.; INOUE, H.Y.; RODRIGUES, G.; MATSUO, T. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 519-527, 2000.

REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 274-285.

REY, L.C.; RAMALHO, I.L.C. Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p.171-174, 1999.

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

ROBERTS, C.W.; ALEXANDER, J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occur in Balb/c mice for the first time during pregnancy. **Parasitology**, v.46, p.143-147, 1992.

RUCHMAN, I.; FOWLER, J.C. Localization and persistence of *Toxoplasma* in tissues of experimentally infected white rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.32, p.25-34, 1951.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Laboratory Investigation**, v.57, p.112-137, 1987.

SAARI, M.; RAISANE, N. Transmission of acute *Toxoplasma* infection. The survival of trophozoites in human tears, saliva, and urine and in cow's. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.52, n.6, p.847-852, 1974.

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

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*T. gondii*). **Science**, v.108, p.660-663, 1948.

SACCO, T.F.; MOIRAGHI-RUGGENINI, A.; MONTE, A. D.; PANTANO, C.; GINANNI, C.; GRAZIANO, E. Epidemiologia della toxoplasmosi. Indagine sierologica sulla diffusione dell'infezione toxoplasmica in cani e gatti dell'area di Torino. **Igiene Moderna**, v.72, p.1220-1232, 1979.

SANGER, V. L.; COLE, C. R. Toxoplasmosis: VI. Isolation of *Toxoplasma* from milk, placentas and newborn pigs of asymptomatic carrier sows. **American Journal Veterinary Research**, v.16, p. 536-539, 1955.

SANTO, A.H.; PINHEIRO, C.E.; JORDAN, M.S. Causas básicas e associadas de morte por Aids, Estado de São Paulo, Brasil, 1998. **Revista de Saude Publica**, v.34, p.581-588, 2000.

SANTOS, C.B.A.; CARVALHO, A.C.F.B.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; YAI, L.E.O.; DUBEY, J.P.; GENARI, S.M. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p.207-211, 2005.

SAWADOGO, P.; HAFID, J.; BELLETE, B. TRAN MANH SUNG, R.; CHAKDI, M.; FLORI, P.; RABERIN, H.; BENT HAMOUNI, I.; CHAIT, A.; DALAL, A. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Marocco. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 89-92, 2005.

SEEFELDT, S.L.; KIRBRIDE, C.A.; DUBEY, J.P. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody test, and direct agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally aborted ovine fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.124-127, 1989.

SILVA, S.Z.C.; VASCONCELLOS, A.C. A lactação In: BEDRAN, J.N. **O uso de drogas na gravidez e na lactação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p.14-23.

SIMS, T.A.; HAY, J.; TALBOT, I.C.. Host parasite relationship in the brains in mice with congenital toxoplasmosis. **Journal of Pathology**, v.156, p.255-261, 1988.

SKINNER, L.J.; TIMPERLEY, A.C.; WIGHTMAN, D.; CHATTERTON, J.L.; HO-YEN, D.O. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. **Scandinavian Journal of Infections Diseases**, v. 22, p.359-361, 1990.

SOGANDARES-BERNAL, F.; MARCHIANDO, A.A.; DUSZYNSKI, D.W.; Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in range dairy cattle from the Bitter-Root Valley of Montan. **Journal of Parasitology**, v.61, p.965, 1975.

SOUZA, A.Z. **Contribuição para o estudo da mama de ratas em estro permanente, em hipotireoidismo experimental**. 1970. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

SPARKES, A. H. Toxoplasmosis en el gato y en el hombre. In: CONGRESSO DE LA ASOCIACIÓN MUNDIAL DE MEDICINA VETERINARIA DE PEQUEÑOS ANIMALES, 1998, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: Asociación Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños Animales, 1998. p. 415-417.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parasita dei Gonioli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia chericorda in multipunti il Kala-Azar dell Uomo. **Revista da Sociedade Cientifica de São Paulo**, v.3, p.109-112, 1908.

TENTER, A.M. Epidemiological importance of animals in the transmission of *Toxoplasma*. **Parasitology International**, v. 47, p. 82, 1998.

TENTER, A. M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v.23, p.391, 1999.

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

TIZARD, I.R. Imunidade no feto e recém-nascido. In: _____ **Imunologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.233-246.

VARGAS, C.S.G. **Títulos de anticorpo da classe IgG anti - *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908) e de oocistos em fezes de gatos de rua (*Felis catus* – LINNAEUS, 1758) em Curitiba, Paraná**. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VILLARD, O.; CANDOLFI, E.; FERGUSON, D.J.P.; MARCELLIN, L.; KIEN, T. Loss of oral infectivity of tissue cysts of *Toxoplasma gondii* RH strain to outbred Swiss Webster mice. **Journal of Pathology**, v. 27, n.12, p. 1555-1559, 1997.

WASTING, J.M.; NICOLL, S.; BUXTON, D. Comparison of two gene of amplification methods for detection of *Toxoplasma gondii* in experimental infected sheep. **Journal of Medical Microbiology**, v.38, p.360-365, 1993.

WILSON, M.; WARE, D.; JURANKEK, D. Serologic aspects of toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, n.2, p.277-281, 1990.

WOLF, A., COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalytozoon (encephantozic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. **Bulletin of the Neurological Institute Kyushu University**, v.6, p. 306-371, 1937.

YAI, L.E.O. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Estado de São Paulo**. 2007. 137p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ZHI-HUI, G.; CHENG-YAN, H.; YONG-SHENG, Z.; SHU-HONG, L.; JUN, D.; LI, L.; YAN-QIU, F.; GANG, Z.; JIA-HE, L. Detection of DNA of *Toxoplasma gondii* in rat by using polymerase chain reaction. **Chinese Journal of Parasitology Parasitic Disease**, v.19, p. 173-175, 2001.

9. ANEXOS

9.1. Anexo A – Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal



A T E S T A D O

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa “**Transmissão galactogênica do *Toxoplasma gondii* na infecção experimental em ratas Wistar**”, Protocolo nº 145/2005-CEEA, de **Veruska Maia da Costa**, aluna do curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível Mestrado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – campus de Botucatu, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 8 de abril de 2008.



Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr. s/n – Botucatu/SP – 13618-000

9.2. Anexo B - Tabelas e Figuras

Tabela 13. Resultado do exame sorológico pela RIFI a MAD para a detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T.gondii*, dos animais pertencentes ao G1, fêmeas inoculadas via oral com 10^4 bradizoítos da cepa BTU4, cronificadas. Botucatu, 2008.

Dias pós infecção	15		30		45		60		75		90	
	RIFI	MAD	RIFI	MAD	RIFI	MAD	RIFI	MAD	RIFI	MAD	RIFI	MAD
Fêmea 1	N	64	256	1024	256	1024	256	1024	256	1024	256	1024
Fêmea 2	64	64	256	1024	256	1024	256	1024	256	1024	256	1024
Fêmea 3	64	64	1024	1024	256	1024	256	1024	256	1024	256	1024
Fêmea 4	N	64	256	1024	256	1024	1024	1024	1024	1024	256	1024
Fêmea 5	N	64	256	4096	1024	4096	1024	4096	1024	4096	1024	4096
Fêmea 6	16	64	256									

N= Negativo; Títulos = 16; 256; 1024; 4096

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)