

ISOLAMENTO DO *Toxoplasma gondii* EM SÊMEN DE CAPRINOS.

Juliana de Souza Pinto Pieroni, Alvimar José da Costa, Luis Fernando Santana, Vanessa Marigo Rocha Pinto, Caroline Pistoni. – Medicina Veterinária – Departamento de Patologia Veterinária – CCPAR – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

A toxoplasmose é uma zoonose de caráter cosmopolita causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário coccídeo de ciclo de vida facultativamente heteroxeno e infecta todas as espécies de animais homeotérmicos, incluindo mamíferos, aves e o homem. É uma doença de elevada importância veterinária, zootécnica e em saúde pública, uma vez que acarreta prejuízos nos animais de produção e de estimação (SMIELEWSKA, et al., 2001), além de servirem de fonte direta ou indireta de infecção para o ser humano (WALSH et al., 1999).

No homem, em infecções primárias, a doença é usualmente subclínica, mas em alguns pacientes pode ocorrer linfadenopatia cervical ou distúrbios oculares. Em infecções adquiridas durante a gestação (principalmente no primeiro ou segundo trimestre) pode ocorrer danos severos ao feto como morte e aborto espontâneo (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Em pacientes neonatos, a toxoplasmose congênita pode se manifestar de várias formas incluindo hidrocefalia, estrabismo, deficiências visuais, calcificações cranianas, coriorretinite, epilepsia, retardamento mental ou psicomotor, trombocitopenia, anemia (MCAULEY, BOYER e PATEL et al, 1994; SWISHER, BOYER e MCLEOD, 1994).

As principais vias de transmissão do *T. gondii* são: infecção transplacentária (taquizoítos circulantes) sendo mais freqüente no terço final da gestação (DUBEY e TOWLE, 1986; MAMIDI *et al.*, 2002); ingestão de água, como sugerem os trabalhos de ARAMINI *et al.* (1999), ou alimentos contaminados com oocistos esporulados oriundos das fezes do gato e, ainda, ingestão de cistos teciduais em carnes cruas e/ou mal cozidas (SILVA *et al.*, 2000).

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

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

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

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

MUNDAY & MASON (1979) foram os primeiros a descreverem a toxoplasmose como importante causa de prejuízos reprodutivos em caprino, acometendo clinicamente tanto animais jovens, como também adultos (DUBEY, 1987). A principal via de infecção é a ingestão de oocistos esporulados do parasito (DUBEY & BEVERLEY, 1988).

As taxas de infecção apontadas para rebanhos caprinos são muito variáveis. Em Minas Gerais, MACHADO & LIMA (1987) encontraram 36,8% de caprinos positivos em 46 propriedades estudadas, com taxas de 36,1% em rebanhos leiteiros e 11,4% nos animais de corte. GONDIM *et al.* (1999)

detectaram 28,93% de caprinos positivos ao teste de aglutinação ao látex, em pesquisa realizada no estado da Bahia. No estado de São Paulo, MAINARDI *et al.* (2003) encontrou taxa de 14,5% de animais sorologicamente positivos em sete diferentes regiões criadouras de caprinos leiteiros.

A toxoplasmose é apontada como a segunda causa de abortos em caprinos na França (CHARTIER & MALLEREAU, 2001) e na Suíça (CHANTON *et al.*, 2002). Desordens reprodutivas, como abortos e neonatos mortos ou fracos que evoluem para óbito geram perdas econômicas consideráveis em rebanhos (VIDOTTO & COSTA, 1987).

Toxoplasma gondii foi isolado no sêmen, pela técnica de bioprova, em três caprinos inoculados oralmente com 10^4 oocistos da cepa GT -1. O parasito foi detectado no sêmen sete dias após a inoculação em um dos caprinos e 12 dias pós-infecção, nos outros dois. O período de excreção perdurou até o 52º dias. (DUBEY e SHARMA, 1980).

A presente pesquisa teve objetivo principal demonstrar pelas técnicas de bioprova e PCR a eventual presença do *T. gondii* em amostras de sêmen colhidas dos caprinos infectados experimentalmente.

Para isso, seis caprinos machos em idade reprodutiva e livres de enfermidades que pudessem causar transtornos ligados à reprodução, foram randomizados em três grupos experimentais através de um sorteio. Dois reprodutores foram inoculados com $1,0 \times 10^6$ taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) por meio de injeção subcutânea e outros dois receberam $2,0 \times 10^5$ oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa P), por meio de uma sonda de metal, que possibilitou depositar o inóculo diretamente no esôfago. Dois animais compuseram o grupo controle, recebendo, por vias oral e subcutânea, placebo.

Nos reprodutores experimentais foram mensurados parâmetros clínicos (temperatura retal, frequências cardíaca e respiratória), dois dias antes da inoculação, nos dias 3, 5, 7, 11, 14 e, semanalmente, até o 70º dia pós-inoculação (DPI). A avaliação clínica se estendeu até o término do experimento e teve o propósito de detectar possíveis alterações clínicas decorrentes da infecção toxoplásmica nos caprinos inoculados com *T. gondii*. Considerando como parâmetro de normalidade 38,5 a 40,5°C, hipertermia foi detectada, apenas no 5º dia após a inoculação nos caprinos do grupo inoculado com oocistos. As variações encontradas nas frequências cardíaca e respiratória podem ser relativas à excitação do animal e temperatura ambiental no momento das colheitas de sêmen.

Hemogramas completos foram realizados, em todos os caprinos experimentais, dois dias antes da inoculação e no 3º, 5º, 7º, 14º DPI e, semanalmente, até o término desta pesquisa (70º DPI). Nos parâmetros hematológicos obtidos, resultantes dos 72 hemogramas efetuados não foram observadas alterações que pudessem ser atribuídas à infecção toxoplásmica.

Nas amostras de soros de todos os caprinos infectados experimentalmente e daqueles que compuseram o grupo controle, obtidas nos dois dias anteriores à inoculação e semanalmente até o final do experimento, foram pesquisados anticorpos contra *T. gondii* por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo CAMARGO (1964). Observou-se a soroconversão (título $\geq 1:16$), a partir do 10º DPI nos caprinos inoculados com taquizoítos e oocistos. Título sorológico máximo (1:4096) foi detectado nos caprinos inoculados com taquizoítos e oocisto nos dias 14º, 21º e 28º DPI. Embora tenham ocorrido variações nos títulos de anticorpos no decorrer do experimento, decréscimos acentuados destes títulos foram observados a partir do 35º DPI nos caprinos de ambos os grupos. Os animais do grupo controle não apresentaram anticorpos contra *T. gondii* ao longo de todo experimento.

A parasitemia foi determinada por meio da inoculação em camundongos (bioprova), segundo técnica descrita por OLIVEIRA (1997). Para o grupo de caprinos inoculados taquizoítos foi encontrado sorologia positiva (RIFI $\geq 1:40$) nos dias 11, 14, 28, 49, 56, 63 e 70 DPI nos camundongos inoculados. Já para o grupo de animais inoculados oocistos sorologia positiva (RIFI $\geq 1:40$) foi encontrada nos dias 14, 21, 56 e 70 DPI.

Dos seis caprinos experimentais foram obtidos ejaculados, com o uso de eletro-ejaculador, dois dias antes da inoculação e nos dias 3, 5, 7, 11, 14, e semanalmente, até o 70º DPI. Logo após a colheita foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: volume, motilidade, concentração, vigor e morfologia. Não foi detectada alteração nos parâmetros espermáticos que pudessem ser relacionadas com a infecção toxoplásmica.

Para o isolamento de *T. gondii* as amostras de sêmen (todas as frações) de cada animal (infectados e controles) foram inoculados em cinco camundongos, via intraperitoneal, com alíquotas

de 0,4 mL do ejaculado. Das 84 amostras de ejaculado obtidas foi possível detectar a presença de *T.gondii* (comprovação sorológica positiva (RIFI $\geq 1: 40$) e presença de cistos cerebrais em camundongos) naquelas colhidas no 5°, 7°, 28°, 49°, 63° e 70° DPI dos animais inoculados com 1×10^6 taquizoítos. E para as amostras seminais, do grupo de animais inoculados com 2×10^5 oocistos, foi encontrada o parasita no 56° e 70° DPI.

Das amostras seminais positivas na sorologia (RIFI) e bioprova em camundongos (presença de cistos cerebrais), foi pesquisada a presença de *T. gondii* pela técnica da PCR (amplificação de fragmentos de 194 pares de bases do gene B1 de *T.gondii*) utilizando-se os “primers” 5’-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3’ (B1₁) e 5’TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC -3’ (B1₂), descritos por FUENTES et al. (1996). E foram constatadas a presença do parasito no 5° (animal nº 11 – inoculado com taquizoíto), 7°, 28°, 49° e 70° (animal nº 01 – inoculado com taquizoíto) 49° e 56° (animal nº 36 – inoculado com oocisto) DPI. No entanto, as outras amostras que foram positivas na RIFI e bioprova apresentaram ausência de positividade de parasitismo pela PCR, o que não descarta a possibilidade de o agente parasitário estar presente nas mesmas, uma vez que 500ng de DNA “genômico” por reação, pode conter uma baixa quantidade de DNA do parasito, que seja insuficiente para visualizar a amplificação de 194 Pb no gel de eletrofore 2% corado com brometo de etídeo (DUBEY & THULLIEZ, 1993).

Portanto, os resultados obtidos possibilitaram comprovar a presença do *Toxoplasma gondii* em ejaculados seminais de caprinos, o que pode tornar possível a transmissão sexual desse protozoário.

Referências Bibliográficas

ARAMINI,J.J.; STEPHEN,C.; DUBEY, J.P.; ENGELSTOFT, C.; SCHWANTJE, H.; RIBBLE,C.S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology and Infection.*, v.122, n. 02, p.305-315; 1999.

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

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

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

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

DUBEY, J.P.; BEVERLEY, J.K.A. Toxoplasmosis of animals and man. *Boca Ráton: Academic*, 1988. 315p.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 41, n. 05, p. 794-795, 1980.

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

GONDIM, L.F.P. et al. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, n.3, v.82, p.273-276, 1999.

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

MAINARDI, R.S.; MODULO, J.R.; STACCHINI, A. V. M.; PADOVANI, C.R.; LANGONI, H. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36: 759-761, nov-dez, 2003.

MAMIDI, A., DeSIMONE, J.A., POMERANTZ, R.J. Central nervous system infectious in individuals with HIV-1 infection. *J. Neurovirol.*, v.8, n.3, p.158-67,2002.

MCAULEY, J., BOYER, K.M., PATEL, D. *et al* Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago collaborative treatment trial. *Clin Infect Dis*, v.18, p.38-72, 1994.

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

MONTOYA, J.G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet* (North American Edition), Stanford, v.363 (9425), p.1965-1976, 2004

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

OLIVEIRA, F. C. R. Infecção experimental de *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* com oocistos de *Toxoplasma gondii*. Estudo comparativo. Jaboticabal:– FCAVJ - Universidade Estadual Paulista, 1997. 92 p. (Dissertação de Mestrado).

SWISHER, C.N.; BOYER, K.; MCLEOD, R. Congenital toxoplasmosis. *Semin Pediatr Neurol*. Vol 1, p.4-25, 1994.

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

SMIELEWSKA, L.E., KLIMENOWSKI, S., PACON, J. Current clinical and diagnostic problems of toxoplasmosis in carnivores. *Medicina Veterinaria*, v.57, n.9, p.641-4, 2001.

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

WALSH, C. P., HAMMOND, S.E., ZAJAK, A.M., LINDSAY, D.S. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, v.46, n.5, p.73 S-74S, 1999.

Bolsa: CNPq/Reitoria