

## Avaliação dos parâmetros seminais de cachaços (*Sus scrofa*) experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*

## Evaluation of semen parameters of boars (*Sus scrofa*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*

Anderson Barbosa de Moura<sup>1\*</sup>; Sérgio Jordão Filho<sup>2</sup>; Daniela Cristina Di Mauro<sup>2</sup>; Beatriz Bassora Paim<sup>2</sup>; Fernanda de Rezende Pinto<sup>2</sup>; Alvimar José da Costa<sup>3</sup>

### Resumo

Com o objetivo de investigar a influência do *Toxoplasma gondii* nos parâmetros seminais e na morfologia espermática de suínos, oito reprodutores foram inoculados com *T. gondii*, sendo constituídos os seguintes grupos experimentais: GI (n=3) 1,5 x 10<sup>4</sup> oocistos da cepa P, via oral; GII (n=3) 1,0 x 10<sup>6</sup> taquizoítos da cepa RH, via subcutânea e GIII (n=2), controle. Foram realizadas avaliações de parâmetros espermáticos (volume, motilidade, vigor, concentração), estudo da morfologia dos espermatozoides, exames sorológicos (RIFI), parasitemia e hemogramas. Para tanto, colheitas de sangue e sêmen foram realizadas nos dias -2, -1, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 e semanalmente até 84 dias pós-inoculação. Nenhuma alteração hematimétrica e nos parâmetros clínicos foi observada nos animais. Parasitemia foi detectada em um animal inoculado com oocistos, no 7º dia pós-infecção (DPI) e em outros dois suínos do GII (taquizoítos), nos 3º e 49º DPI. Exames sorológicos revelaram a presença de anticorpos contra *T. gondii* nos animais inoculados com oocistos ou taquizoítos a partir do 7º dia pós-infecção (DPI), com títulos de 256 e 64, alcançando pico de 4096 nos dias 11 e 9 pós-inoculação, respectivamente. O GIII (controle) manteve-se negativo durante todo o período experimental. Os parâmetros espermáticos avaliados não apresentaram nenhuma alteração que pudesse ser atribuída a toxoplasmose. Diferenças significativas (P<0,05) quanto às patologias espermáticas não foram observadas entre os grupos inoculados e o grupo controle.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose, cachaço, parâmetros seminais, morfologia espermática.

### Abstract

Aiming to investigate the influence of *T. gondii* on semen parameters and spermatozoa morphology, eight boars were inoculated with *T. gondii*. Experimental groups consisted of: GI (n=3) 1,5 x 10<sup>4</sup> oocysts of P strain; GII (n=3) 1,0 x 10<sup>6</sup> tachyzoites of RH strain and GIII (n=2), control noninoculated. Evaluations of semen parameters (volume, motility, strength, concentration), study of spermatozoa morphology, serology (RIFI), parasitemia and hemograms were performed. For this purpose, blood and semen collection were carried out on days -2, -1, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 and weekly until 84 days post-inoculation. Non hematimetrics alterations and clinical signs were observed on animals. Parasitemia was detected in an animal inoculated with oocysts, on the 7<sup>th</sup> day post inoculation (DPI) and in two pigs of GII (tachyzoites), on the 3<sup>rd</sup> and 49<sup>th</sup> DPI. Serology results revealed the presence of antibody anti-*T. gondii* on the animals inoculated with oocysts or tachyzoites since 7<sup>th</sup> DPI, with titles of 256 and 64, reaching a maximal level of 4096 on days 11 and 9 post inoculation, respectively. The GIII (control) was negative through out all experimental period. The semen parameters evaluated did not present any alteration due to toxoplasmosis. Significant differences (P<0,05), considering spermatozoa pathology, were not observed between inoculated and control groups.

**Key words:** Toxoplasmosis, boar, semen parameters, spermatozoa morphology.

<sup>1</sup> Aluno Doutorado Medicina Veterinária (Patologia Animal) – FCAV – UNESP – Jaboticabal – SP; Prof. Doenças Parasitárias– Unicentro–Universidade Estadual do Centro-Oeste–Guarapuava, PR. Email: anderbmoura@hotmail.com

<sup>2</sup> Discente de Medicina Veterinária – FCAV – UNESP

<sup>3</sup> Prof. Titular de Parasitologia Veterinária – FCAV – UNESP / CPPAR – FCAV – UNESP.

\* Autor para correspondência.

## Introdução

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório, com ciclo biológico complexo e que acomete praticamente todas as espécies de sangue quente (DUBEY; BEATTIE, 1988), normalmente sem a manifestação de sinais clínicos, sendo, porém, capaz de desencadear doença severa, principalmente na sua forma congênita (DUBEY, 1993).

Entre os animais de produção, o suíno é um dos que mais frequentemente apresenta-se infectado (DUBEY; THULLIEZ, 1993), sendo que a sua carne é considerada a principal via de transmissão para o ser humano nos EUA e, provavelmente em vários outros países (GAMBLE, 1997). Dubey et al. (2002), observaram alta prevalência (92,73%) de *T. gondii* viáveis em coração e língua de suínos de abatedouro. Nesta espécie animal o *T. gondii* pode permanecer viável, na forma de cistos, por mais de um ano na sua musculatura (DUBEY, 1994) ou durante toda a sua vida (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A alta prevalência da toxoplasmose em suínos pode estar diretamente ligada a uma menor resistência desta espécie ao parasita e às próprias condições de exploração da suinocultura que expõem estes animais a uma maior probabilidade de contato com os oocistos eliminados pelos gatos (VIDOTTO et al., 1990). Manifestações clínicas e respostas imunológicas da toxoplasmose em suínos podem ser variáveis, estando dependentes das diferentes cepas do parasita (JUNGERSEN et al., 1999). Vários surtos de toxoplasmose adquirida têm sido relatados em suínos, com manifestações de pneumonia, encefalite e aborto (DUBEY, 1977).

Inquéritos sorológicos realizados no Paraná, em suínos de abatedouros, evidenciaram 16,33% (AMARAL; SANTOS; REBOUÇAS, 1978) e 34,62% (VIDOTTO; NAVARRO; MOCO, 1986) de positividade dos animais. Em Porto Alegre, Fialho e Araujo (2003) encontraram 20% (hemaglutinação indireta) e 33,75% (imunofluorescência indireta) dos animais de abate positivos. Em Londrina, Vidotto et al. (1990) identificaram, em todas as categorias

zootécnicas, 37,84% dos suínos soropositivos, com as matrizes apresentando positividade em 46,2%.

Garcia et al (1999), num estudo da soroprevalência em suínos no município de Jaguapitã, Paraná, observaram taxas de 24% de positividade, com diferença estatística nas faixas etárias, evidenciando que a soropositividade aumenta com a idade dos animais. O mesmo foi relatado por Araujo, Santos e Souza (1998), no Rio Grande do Sul, e por Lunden et al. (2002), na Suécia, onde a prevalência em animais adultos foi de 17,3% contra 3,3% nos suínos de engorda.

Em uma granja suinícola, localizada na região de Londrina, Paraná, com problemas de ordem reprodutiva como natimortos, abortos e mortalidade de leitões, Giraldo et al. (1996) detectaram 24 das 43 matrizes envolvidas (55,8%) com sorologia positiva para toxoplasmose. O *T. gondii* também já foi detectado em outros casos de desordens reprodutivas em suínos (JONES; HUNTER, 1979; DELBEM et al., 1999).

Embora inexistam na literatura dados a respeito, os cachacos, pela sua idade, devem apresentar uma prevalência desta zoonose mais elevada que outras categorias (leitão, animais de engorda), uma vez que a frequência da infecção pelo *T. gondii* em suínos aumenta proporcionalmente à idade dos animais.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito da infecção toxoplásmica em cachacos e sua influência sobre os parâmetros seminais (volume, motilidade, vigor e concentração) e a morfologia espermática desta categoria animal.

## Materiais e Métodos

### 1. Cepas de *Toxoplasma gondii*

Foram utilizadas as cepas “P” (JAMRA; VIEIRA, 1991) e “RH” (SABIN, 1941) de *T. gondii*, mantidas junto ao “Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR)” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal -

UNESP, por meio de inoculações periódicas de cistos cerebrais (cepa P) e/ou taquizoítos (cepa RH) em camundongos albinos. Os oocistos de *T. gondii* foram obtidos de forma semelhante à técnica descrita por Dubey et al. (1977).

## 2. Delineamento experimental

Oito reprodutores, com idade de 12 meses, sorologicamente negativos para *T. gondii* segundo a técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), considerando como negativos aqueles com título <16, foram selecionados para este trabalho. Exames sorológicos para a detecção de anticorpos contra doenças infecciosas que possam provocar distúrbios reprodutivos, como brucelose (ALTON et al., 1988) e leptospirose (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985), foram realizados previamente e mensalmente durante o experimento.

Todos os animais foram mantidos em baias individuais, pertencentes ao CPPAR (Centro de Pesquisas em Sanidade Animal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP. Água e alimentação foram fornecidas “*ad libitum*”.

Os suínos foram divididos em três grupos experimentais: O Grupo I (GI), com três animais, recebeu  $1,5 \times 10^4$  oocistos da cepa P de *T. gondii*, via oral, após jejum prévio de 12 horas; o Grupo II (GII), com três animais, foi inoculado, via subcutânea, com  $1,0 \times 10^6$  taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*; o Grupo III (GIII), com dois suínos, recebeu 200 mL de solução fisiológica, via oral, constituindo o grupo controle. Todas as doses de inóculos informadas foram individuais.

As fezes dos suínos inoculados com oocistos foram removidas diariamente e tratadas com desinfetante (formalina, 40%), por sete dias consecutivos após a infecção, para a destruição dos oocistos eventualmente presentes nos dejetos dos animais experimentais.

## 3. Exames Clínicos

Os animais foram avaliados diariamente,

iniciando-se dois dias antes das inoculações e estendendo-se até o final do experimento, por meio da inspeção visual e dos parâmetros frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal.

## 4. Exames hematológicos

Hemogramas foram realizados em todos os animais nos dias -2, -1, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 e a cada sete dias pós-inoculação até o 84º DPI com técnicas usuais de hematimetria. Tais exames foram realizados junto ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV/UNESP.

## 5. Determinação da parasitemia

A parasitemia foi determinada nas mesmas datas dos hemogramas, segundo a técnica descrita por Oliveira (1997), por meio de inoculação da camada leucocitária do sangue dos suínos em camundongos e posterior sorologia (Reação de Imunofluorescência Indireta- RIFI) para a pesquisa de anticorpos contra *T. gondii*. Foram considerados positivos aqueles que apresentaram reação na diluição >1:16.

## 6. Resposta Imune Humoral

Nos soros de todos os suínos reprodutores infectados experimentalmente e dos controles, obtidos nos dias -2, -1, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 após a infecção e, semanalmente, até o fim do experimento foram pesquisados anticorpos contra *T. gondii* por meio da RIFI, segundo Camargo (1964). Para a realização da RIFI, foi utilizado como antígeno taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* e como conjugado, gamaglobulina anti-IgG total de suíno marcado com isotiocianato de fluoresceína (1:100) (Sigma-Chemical, St. Louis, EUA). Considerou-se como positivos títulos  $\geq 1:64$  para a espécie suína.

## 7. Avaliação espermática

### 7.1 - Colheita do sêmen

Dos oito suínos experimentais foram obtidos ejaculados nos dias -2, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 e, na sequência, semanalmente até 84º DPI, pela técnica da “mão enluvada” descrita por Wentz e Bortolozzo

(1998). Os ejaculados foram recolhidos em beakers previamente esterilizados, mantidos a 37°C e, no momento da colheita, acoplados a um recipiente aquecido para evitar o choque térmico e a mortalidade dos espermatozoides. Imediatamente após o término da ejaculação, o becker contendo o sêmen era colocado em banho-maria (38 a 40°C) para garantir a integridade espermática.

## 7.2 - Parâmetros seminais

### 7.2.1 - MOTILIDADE E VIGOR

Para avaliação da motilidade e do vigor, uma alíquota do sêmen (aproximadamente 10µl) foi colocada sobre lâmina e recoberta por lamínula (previamente aquecidas a 38°C) e observada ao microscópio óptico (aumentos de 10 e 40X) imediatamente após a colheita. Estes exames foram realizados em triplicata para cada uma das amostras. Os dados de motilidade foram expressos em porcentagem, e os de vigor numa escala de 0 a 5.

### 7.2.2 - CONCENTRAÇÃO E VOLUME

Para análise da concentração espermática foram obtidas alíquotas de 20µl, diluídas em 980µl de solução salina formol (0,9%). A concentração foi aferida através de contagem em câmara de Neubauer conforme Corrêa et al. (2001). O volume seminal foi verificado através da observação direta da gradação, medida numa proveta de 500 mL.

### 7.2.3 - MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Para a análise da morfologia espermática foram obtidas alíquotas de 50µl de sêmen, diluídas em 1 mL de solução salina formol (0,9%). A morfologia seminal, para evidenciar possíveis patologias espermáticas, foi realizada de acordo com os critérios padronizados por Blom (1973), através de microscopia de contraste de fase, conforme o Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998).

## 8. Análises estatísticas

Os parâmetros seminais pré e pós-inoculação foram avaliados por meio de análise de variância com medidas repetidas no tempo sendo um fator entre os animais, com três níveis (controle, taquizoitos e oocistos) e um fator dentro dos animais, com 18 níveis (tempo). Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa SAS (1989).

## Resultados

### Exames Clínicos

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros clínicos avaliados. Embora hipertermia, taquicardia e taquipnéia tenham sido verificadas em vários momentos ao longo do experimento, nos animais dos três grupos, estatisticamente não foram relacionados à infecção toxoplásmica.

Um animal do grupo inoculado com oocistos, a partir do 61º DPI, apresentou um quadro clínico de artrite e, em função desta patologia, a colheita de sêmen deste animal não pode mais ser realizada até o final do experimento. No 26º DPI um animal do grupo controle, que apresentou um quadro de dificuldade de locomoção associado com inapetência, foi submetido a exames radiográficos da articulação fêmur-tíbia-patelar, sendo diagnosticado uma osteomielite. Este quadro se prolongou até o 50º DPI, quando se realizou eutanásia e necropsia. Este processo infeccioso inviabilizou a colheita de sêmen deste animal do 28º DPI até a conclusão do experimento.

### Exames hematológicos

As contagens totais de hemácia e os valores de hemoglobina permaneceram normais em todos os animais durante o experimento e somente um animal (suíno 08) apresentou hematócrito (31,1%) abaixo do limite inferior de 36%, no 42º DPI.

Os leucogramas de todos os animais apresentaram valores dentro da normalidade, não sendo observada nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos.

#### Determinação da parasitemia

A presença do parasita no sangue dos animais inoculados pode ser constatada nos 49º e 7º DPI em suínos inoculados com taquizoítos e oocistos, respectivamente. Também foi observada parasitemia, de forma direta em um suíno inoculado com taquizoítos, no 3º DPI, conforme atesta a presença de taquizoítos no exsudado peritoneal de dois dos três camundongos inoculados com os leucócitos deste animal, confirmada ainda pela sorologia positiva dos camundongos reinoculados com este exsudato.

#### Resposta Imune Humoral

Observou-se a soroconversão (título  $\geq 1:64$ ) a partir do 7º DPI em ambos os grupos inoculados tanto com taquizoítos quanto com oocistos, sendo a diluição 4096 o título máximo verificado (no 11º DPI).

Diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) não foram verificadas nas recíprocas de títulos de anticorpos contra *T. gondii* entre os grupos inoculados, com taquizoítos ou oocistos.

Os animais do grupo controle não apresentaram anticorpos contra *T. gondii* em nenhum momento ao longo do experimento.

#### Parâmetros seminais

Diminuição do volume do ejaculado ( $< 200$  mL) foi observada nos animais do grupo controle (GIII) no 9º, 11º, 21º, 49º, 56º, 77º e 84º DPI. Quanto aos suínos do grupo GII (taquizoítos) houve diminuição do volume do ejaculado nos dias -2 e 5º DPI, e para os suínos inoculados com oocistos (GI), ocorreu diminuição do volume no 1º DPI.

Motilidade espermática diminuída ( $< 70\%$ ) foi evidenciada nos dias 7º, 70º e 84º DPI somente nos suínos do GI (oocistos).

Na avaliação do vigor dos espermatozoides, todos os animais do experimento (controles e inoculados), durante todo o período experimental, apresentaram ejaculados dentro da normalidade ( $\geq 3$ ).

Concentração espermática diminuída ( $< 200 \times 10^6$  spz/mL) foi verificada no sêmen dos animais do grupo controle (GIII) nos 3º, 5º, 7º, e 11º DPI, enquanto que nas amostras oriundas dos suínos dos grupos GII (taquizoítos) e GI (oocistos), decréscimo no número de espermatozoides ocorreu nos 7º, 9º e 11º DPI e nos 1º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º e 14º DPI, respectivamente.

#### Morfologia espermática

Conforme Corrêa et al. (2001), as patologias espermáticas dos suínos são classificadas segundo o Quadro 1, que também exprime o limite máximo de ocorrência de cada uma delas para um animal saudável e apto às atividades reprodutivas.

**Quadro 1.** Classificação das alterações morfológicas das células espermáticas de suínos.

Alterações	Limite Máximo (%)
Alterações de acrossoma	5
Alterações de cabeça	5
Alterações de colo	5
Gota Citoplasmática Proximal	10
Alterações de peça intermediária	5
Gota Citoplasmática Distal	*
Alterações de cauda	10
Total de anormalidades permitidas	20

\* Gota citoplasmática distal = sem significado patológico (adaptado de COORÉA et al., 2001)

Embora o autor não considere a gota citoplasmática distal (GCD) como sinal patológico, em concordância com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen dos Animais, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998),

trabalhos recentes demonstram os efeitos negativos desta patologia sobre os índices de fertilidade. Assim, apesar de não considerarmos um valor máximo de ocorrência da GCD, o mesmo foi computado para o cálculo do valor total de alterações permitidas.

Pode-se identificar nos suínos do grupo controle (GIII) uma porcentagem de patologias totais acima do normal nos dias 42, 49, 56 e 63º DPI (21%, 45%, 33% e 32%). Nos reprodutores inoculados com taquizoítos, um aumento total das patologias acima de 20% foi observada nos dias -2, 5, 11, 35, 42, 49, 63 e 84 DPI enquanto para aqueles inoculados com oocistos, o mesmo se observou nos dias 14, 35, 42 e 49 DPI.

Os resultados da avaliação dos parâmetros seminais e das patologias espermáticas estão expressos na Tabelas 1, 2 e 3 (valores médios).

As análises estatísticas não revelaram influência da inoculação de *T. gondii* (taquizoítos ou oocistos) sobre os parâmetros seminais e/ou na morfologia espermática ao longo do experimento e nem entre os diferentes grupos. Entretanto, diferença significativa ( $P < 0,05$ ) foi observada na contagem total das patologias espermáticas no grupo inoculado com oocistos, no 14º DPI, em relação ao grupo controle, quando o teste de Tukey foi aplicado na comparação das médias, de forma individual, para cada dia.

**Tabela 1.** Parâmetros seminais de suínos não inoculados (controle).

DPI	Volume	Motilidade	Vigor	Concentração	Patologias						
					Cabeça	G.C.P	PI	Cauda	Outros	G.C.D.	Total
-2	280,00	80,00	3,50	501,25	1,50	0	0	4,00	0	2,50	8,00
1	275,00	70,00	3,50	231,25	0	0,50	0	6,50	0	0,50	7,50
3	202,50	75,00	3,50	119,38	0,50	0,50	0	5,50	0	0	6,50
5	265,00	75,00	3,50	188,13	0	1,00	0,50	2,50	0	2,00	6,00
7	232,50	80,00	3,50	67,50	0	0	0	8,50	0	0,50	9,00
9	131,50	90,00	3,50	321,25	0,50	0,50	0,50	5,00	0	0,50	7,00
11	175,00	75,00	4,00	132,50	4,50	0,50	0	6,50	0	0	12,00
14	257,50	80,00	4,00	207,50	0	0	0	2,00	0	0,50	2,50
21	195,00	75,00	4,00	276,25	0	0	0	8,00	0	0	8,00
28	285,00	80,00	4,00	235,00	0	0	0	2,00	0	0	2,00
35	260,00	80,00	4,00	315,00	0	1,00	0	5,00	0	0	6,00
42	235,00	80,00	3,00	493,75	0	2,00	0	18,00	0	1,00	21,00
49	55,00	80,00	4,00	286,00	0	1,00	0	29,00	0	15,00	45,00
56	155,00	80,00	4,00	342,50	0	1,00	0	31,00	0	1,00	33,00
63	200,00	80,00	4,00	435,00	0	2,00	0	27,00	0	3,00	32,00
70	215,00	80,00	4,00	503,75	0	0	0	15,00	0	0	15,00
77	60,00	70,00	3,00	486,25	0	2,00	0	5,00	0	2,00	9,00
84	85,00	80,00	4,00	392,50	0	0	0	10,00	0	0	10,00

Volume (mL), Motilidade (%), Concentração ( $n \times 10^6$  spzt/mL), Patologias (%)

G.C.P. = Gota citoplasmática Proximal

G.C.D. = Gota citoplasmática Distal

PI = Peça Intermediária

**Tabela 2.** Parâmetros seminais de suínos inoculados com  $1,0 \times 10^6$  taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

DPI	Volume	Motilidade	Vigor	Concentração	Patologias						
					Cabeça	G.C.P	PI	Cauda	Outros	G.C.D.	Total
-2	171,67	76,67	3,67	442,92	0,33	2,33	0,33	15,00	0	12,00	30,00
1	235,00	73,33	3,33	365,00	0	0	0	4,50	0	1,50	6,00
3	276,67	80,00	3,67	256,67	0	1,33	0	11,33	0	0,33	13,00
5	185,00	73,33	3,33	200,42	6,67	0,67	0	12,67	0	0,67	20,67
7	265,00	80,00	3,67	110,83	0	2,33	0	9,33	0	2,00	13,67
9	253,33	70,00	3,33	105,83	6,67	1,33	0	9,67	0	0,67	12,33
11	225,00	80,00	3,67	136,67	4,33	1,33	0	17,33	0	1,00	24,00
14	243,33	76,67	4,00	214,58	3,00	0,67	0	10,00	0	0,67	14,33
21	233,33	70,00	3,67	299,58	0	1,00	0	14,00	0	3,67	18,67
28	303,33	73,33	3,67	411,67	4,00	0,33	0	12,67	0	0,67	17,67
35	201,67	73,33	3,67	407,92	3,67	1,33	20,00	18,33	0	2,33	45,67
42	257,50	70,00	3,67	452,92	0,67	0	0	30,00	0	0,67	31,33
49	256,67	80,00	3,33	263,75	4,33	1,67	0	38,33	0	0,33	44,67
56	218,33	80,00	4,00	359,08	0,33	0,33	0	17,67	0	1,67	20,00
63	268,33	80,00	4,00	479,58	1,33	0	0	39,00	0	2,67	43,00
70	255,00	76,67	3,67	386,67	0,33	0,33	0	19,33	0	0	20,00
77	238,33	70,00	3,00	375,83	0,67	0,67	0	13,00	0	0,67	15,00
84	211,67	73,33	3,67	564,17	0	2,33	0	27,33	0	4,00	33,67

Volume (mL), Motilidade (%), Concentração ( $n \times 10^6$  spzt/mL), Patologias (%)

G.C.P. = Gota citoplasmática Proximal

G.C.D. = Gota citoplasmática Distal

PI = Peça Intermediária

**Tabela 3.** Parâmetros seminais de suínos inoculados com  $1, 5 \times 10^4$  oocistos de *Toxoplasma gondii*.

DPI	Volume	Motilidade	Vigor	Concentração	Patologias						Total
					Cabeça	G.C.P	PI	Cauda	Outros	G.C.D.	
-2	280,00	80,00	3,33	411,67	0,33	0	1,00	2,67	0	0,67	4,67
1	198,33	76,67	3,00	194,17	1,67	0,33	0,33	1,33	0	0,33	4,00
3	225,00	76,67	4,00	169,17	0,67	0,33	0	4,00	0	0	5,00
5	276,67	76,67	3,33	146,67	4,00	0,67	0	7,33	0	0,33	12,33
7	211,67	66,67	3,00	101,67	1,67	0,33	0	3,33	0	0	5,33
9	260,00	70,00	3,50	153,13	2,00	0	0,50	3,00	0	0	5,50
11	246,67	76,67	3,33	117,50	0	0,33	0	7,00	0,33	0,33	8,00
14	228,33	73,33	3,67	184,17	1,67	0,33	0	26,67	0	1,00	29,67
21	236,67	73,33	3,67	342,08	2,67	0	0	7,67	0	1,33	11,67
28	261,67	73,33	3,67	319,17	0,33	0,33	0	9,33	0	2,00	12,00
35	255,00	70,00	3,33	336,67	0,33	1,00	0	21,00	0	2,00	24,33
42	208,33	73,33	3,33	347,08	0,67	0,67	0	27,33	0	0,33	29,00
49	250,00	70,00	4,00	411,67	11,67	0,33	0	18,00	0	0,33	30,33
56	270,00	80,00	3,33	300,83	4,00	0,67	0	10,33	0	0	15,00
63	230,00	75,00	4,00	306,25	0,50	0	0	14,50	0	0	15,00
70	272,50	65,00	4,00	378,13	4,50	0	0	12,50	0	0,50	17,50
77	240,00	75,00	3,50	373,75	4,00	0	0	4,00	0	0,50	8,50
84	322,50	65,00	3,50	343,75	1,00	2,00	0	10,50	0	0	13,50

Volume (mL), Motilidade (%), Concentração ( $n \times 10^6$  spz/mL), Patologias (%)

G.C.P. = Gota citoplasmática Proximal

G.C.D. = Gota citoplasmática Distal

PI = Peça Intermediária

## Discussão

A infecção toxoplásmica dos cachaços, após a inoculação de taquizoítos ou oocistos de *T. gondii*, foi confirmada pela demonstração da parasitemia e também pela soroconversão dos animais inoculados. Entretanto, a infecção experimental não resultou em sintomatologia clínica da doença nos animais. Estes resultados estão de acordo com observações prévias (DUBEY, 1988; ANDREWS et al., 1997; DUBEY et al. 1997; LIND et al., 1997) nas quais suínos inoculados com taquizoítos e/ou oocistos também não desenvolveram sintomatologia clínica de toxoplasmose. Ao contrário, trabalhos de Vidotto e Costa (1987) e Dubey e Urban (1990), relatam hipertermia, anorexia, prostração, sintomatologia respiratória e óbitos em decorrência da inoculação de *T. gondii*. Dubey (1986), em uma revisão, afirma que a maioria das infecções por *T. gondii* em suínos é subclínica.

A ausência de sintomas clínicos nos animais do presente estudo pode refletir uma baixa dose dos inóculos utilizados se considerarmos o peso dos animais no momento da inoculação (entre 100 e 109 Kg). A dose estabelecida para este trabalho foi determinada com base em relatos anteriores levando-se em conta a alta sensibilidade da espécie suína à toxoplasmose.

Com o aumento da demanda por uma suinocultura geneticamente superior, várias biotecnologias ligadas

à reprodução, como inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização in vitro e clonagem, tem sido propostas e aperfeiçoadas recentemente, de forma que o maior benefício da análise do sêmen é a detecção de ejaculados de baixa qualidade.

Os parâmetros seminais e a morfologia espermática podem ser influenciados por diversos fatores como erro de interpretação por parte dos observadores (MATTOS, 1995 apud BORTOLOZZO et al., 2000), causas infecciosas, como o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRIETO et al., 1996), condições climáticas (MADZIROV et al., 2002) e até por características fenotípicas como tamanho/volume testicular (OWSIANNY et al., 1998).

Cachaços jovens tendem a apresentar um maior percentual de gotas citoplasmáticas, principalmente do tipo distal (OWSIANNY et al., 1998). Entretanto, com exceção do 49º DPI e -2 DPI nos grupos controle e taquizoítos, respectivamente, todos os ejaculados apresentaram contagens aceitáveis desta patologia espermática, não se confirmando esta perspectiva.

No presente estudo, a diminuição da concentração espermática pode ser observada nos cachaços dos três grupos. Esta menor densidade de espermatozoides verificada esteve restrita aos dias iniciais do experimento (do 1º ao 14º DPI), indicando que esta redução pode ter origem na alta frequência

de colheita durante esta fase do experimento. O mesmo foi observado por Kuo e Yang (1997a) que demonstraram que colheitas de sêmen em dias intercalados (três vezes por semana) diminuiu a concentração em 26% (jovens cachacos) ou 46% (cachacos maduros). As altas temperaturas ambientais verificadas ao longo do experimento (14,8°C e 27,6°C, médias mínima e máxima, respectivamente) também pode ter sido outro fator que contribuiu para esta menor concentração em concordância com outros estudos (KUNAVONGKRIT; PRATEEP, 1995; KUO; HUANG; LEE, 1997b).

Embora tenham sido observadas contagens de patologias espermáticas totais acima do limite máximo (> 20%) em alguns animais ao longo do experimento, estas não foram relacionadas à infecção toxoplásmica, podendo estar dependentes de técnicas de colheita e manipulação do sêmen ou, ainda, da idade dos animais (OWSIANNY et al., 1998). Contagens totais de patologias acima de 20% foram, na sua grande maioria, influenciadas notadamente por alterações de cauda dos espermatozoides, em particular pela presença da patologia identificada como *Bent-Tail* (cauda em laço com retenção de gota citoplasmática distal). Considerada a alteração mais frequentemente encontrada no sêmen suíno (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998), a presença desta patologia reflete alterações extragonadais (após a espermatogênese estar completa) como a frequência de colheita do sêmen (HURTGEN et al., 1980 apud PRIETTO et al, 1996) ou ainda influências adversas durante a colheita e processamento do ejaculado. Além disto, variações individuais também podem ser responsáveis pelas alterações observadas.

Um efeito direto do *T. gondii* na espermatogênese deveria ser acompanhado de um aumento significativo da frequência de patologias primárias bem como de alterações relevantes nos parâmetros seminais. Entretanto, em nosso trabalho, foi observado, quase que exclusivamente, um aumento das patologias ligadas à cauda do espermatozoide

(*Bent Tail*), indicando que a espermatogênese dos cachacos inoculados não foi afetada de forma significativa pelo *T. gondii*.

## Conclusões

Com base nos dados obtidos no presente experimento, pode-se concluir que cachacos jovens, inoculados com  $1,0 \times 10^4$  oocistos (cepa P) ou  $1,0 \times 10^6$  taquizoítos (cepa RH) de *T. gondii*, embora tenham desenvolvido resposta imune humoral compatível, não desenvolveram sintomatologia clínica da infecção toxoplásmica nem sofreram alterações na espermatogênese que fosse refletida nos parâmetros seminais e/ou na morfologia espermática.

## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através da concessão de bolsas (doutorado e iniciação científica) processos nºs: 01/10643-9, 02/02812-8, 02/02813-4 e 02/02814-0 e parcialmente financiado pelo Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) da FCAV-Unesp.

## Referências

- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988.
- AMARAL, V.; SANTOS, S. M.; REBOUÇAS, M. M. Considerações sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de suínos provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina, Ceará e Piauí, Brasil. *O Biológico*, São Paulo, v.44, p.117-120, 1978.
- ANDREWS, C. D.; DUBEY, J. P.; TENTER, A. M.; WEBERT, D. W. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens H4 and H11: use in ELISAs for detection of toxoplasmosis in swine. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.70, n.1-3, p.1-11, 1997.
- ARAUJO, F. A. P.; SANTOS, J. R.; SOUZA, W. J. S. Detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected pigs by enzyme-linked immunosorbent assay

- (ELISA) in the area of great Erechim, RS, Brazil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS*, Porto Alegre, v.26, n.2, p.57-65, 1998.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaermedicin*, Copenhagen, v.25, p.383-391, 1973.
- BORTOLOZZO, F. P.; BENNEMANN, P. E.; WENTZ, I.; CARDOSO, M. R. I. Avaliação de doses inseminantes produzidas em centrais de inseminação artificial de suínos no sul do Brasil. II. Qualidade espermática. *Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS*, Porto Alegre, v.28, n.2, p.63-75, 2000.
- CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v.6, n.3, p.117-118, 1964.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Manual para o diagnóstico de laboratório de la leptospirosis*. Buenos Aires: 1985. (Norma Técnica 30).
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- CORRÊA, M. N.; MEINCKE, W.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J. C. *Inseminação artificial em suínos*. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001.
- DELBEM, A. C. B.; FREIRE, R. L.; FREITAS, J. C.; SILVA, C. A.; MULLER, E. E.; ALVES, L. A.; OLIVEIRA, R. C.; PRUDENCIO, L. B.; TSUTSUI, V. S. Reproductive problems due to *Leptospira* and *Toxoplasma gondii* at a pig farm in northern Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1999. p.289-290.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J. P. (Ed.). *Parasitic protozoa*. Nova York: Academic Press, 1977. v.3.
- \_\_\_\_\_. A review of toxoplasmosis in pig. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.19, p.181-223, 1986.
- \_\_\_\_\_. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.49, n.6, p.910-913, 1988.
- \_\_\_\_\_. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming of human and animals. In: KREIER, J. P. *Parasitic protozoa*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p.1-157.
- \_\_\_\_\_. Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.205, n.11, p.1593-1598, 1994.
- DUBEY, J. P.; ANDREWS, C. D.; THULLIEZ, P.; LIND, P.; KWOK, O. C. H. Long-term humoral antibody responses by various serologic tests in pigs orally inoculated with oocysts of four strains of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.68, p.41-50, 1997.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988.
- DUBEY, J. P.; GAMBLE, H. R.; HILL, D.; SREEKUMAR, C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *Journal of Parasitology*, Lancaster, v.88, n.6, p.1234-1238, 2002.
- DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.54, n.2, p.270-273, 1993.
- DUBEY, J. P.; URBAN, J. F. Diagnosis of transplacentally induced toxoplasmosis in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.51, n.8, p.1295-1299, 1990.
- FIALHO, C. G.; ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.05, p.893-897, 2003.
- GAMBLE, H. R. Parasites associated with pork and pork products. *Revue Scientifique et Technique*, Paris, v.16, n.2, p.496-506, 1997.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.29, n.1, p.91-97, 1999.
- GIRALDI, N.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; VIOTTI, N. M. A.; BUENO, S. G.; VIDOTTO, O. Estudo da toxoplasmose congênita natural em granjas de suínos em Londrina, PR. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.48, n.2, p.83-90, 1996.
- JAMRA, L. M. F.; VIEIRA, M. P. L. Isolamento do *Toxoplasma gondii* de exsudato peritoneal e órgãos de camundongos com infecção experimental. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v.33, p.435-441, 1991.
- JONES, M. A.; HUNTER, D. H. *Toxoplasma* infection in a newborn piglet. *Veterinary Record*, London, v.9, p.529, 1979.
- JUNGENSEN, G.; JENSEN, L.; RIBER, U.; HEEGAARD, P. M.; PETERSEN, E.; POULSEN, J. S.; BILLE-HANSEN, V.;

- LIND, P. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.29, n.8, p.1307-1319, 1999.
- KUO, Y. H.; YANG, T. S. Effect of ejaculation frequency on the quality and fertility of fresh and thawed frozen semen in boars of 10 and 24 months of age. *Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry*, Taipei, v.67, n.1, p.45-50, 1997a.
- KUO, Y. H.; HUANG, S. Y.; LEE, Y. P. Effects of breed and season on semen characteristics of boars in subtropical areas. *Journal Chinese Society Veterinary Science*, Taipei, v.23, n.2, p.114-122, 1997b.
- KUNAVONGKRIT, A.; PRATEEP, P. Influence of ambient temperature on reproductive efficiency in pigs: (1) boar semen quality. *Pig Journal*, Malmesbury, v. 35, p. 43-37, 1995.
- LIND, P.; HAUGEGAARD, J.; WINGSTRAND, A.; HENRIKSEN, S. A. The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.71, p.01-15, 1997.
- LUNDEN, A.; LIND, P.; ENGVALL, E. O.; GUSTAVSSON, K.; UGGLA, A., VAGSHOLM, I. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Stockholm, v.34, n.5, p.362-365, 2002.
- MADZIROV, H.; TRAJCEV, M.; GERU, N.; TONEVSKI, J. Effect of climate condition in the boar house on the production and quality of sperm. *Macedonian Agricultural Review*, v.49, n.1-2, p.39-45, 2002.
- OLIVEIRA, F. C. R. Infecção experimental de *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* com oocistos de *Toxoplasma gondii*. Estudo Comparativo. 1997. 92 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrária e Veterinária, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 1997.
- OWSIANNY, J.; KAWÊCKA, M.; CZARNECKI, R.; RÓZYCKI, M. Relationship between the size of testes and the quantitative and qualitative parameters of the semen of Young boars. *Pig News and Information*, Farnham Royal, v.19. n.2, p.57N-60N, 1998.
- PRIETO, C.; SUÁREZ, P.; BAUTISTA, J. M.; SÁNCHEZ, R.; RILLO, S. M.; SIMARRO, I.; SOLANA, A.; CASTRO, J. M. Semen changes in boars after experimental infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology*, Stoneham, v.45, p.383-395, 1996.
- SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 116, p. 801-807, 1941.
- SAS. Institute. *SAS User's Guide: statistics*. Cary, NC: SAS Institute, 1989.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.30, p.1217-1258, 2000.
- VIDOTTO, O.; COSTA, A. J. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. I: Observações clínicas e hematológicas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.39, p.623-639, 1987.
- VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; MOCO, C. A. Prevalência de *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em matadouros no norte do Paraná. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 2., 1986, Londrina. *Anais...* Londrina: UEL, 1986. p.23.
- VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; GIRALDI, N.; MITSUKA, R.; FREIRE, R. L. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina, PR. *Semina*, Londrina, v.11, n.1, p.53-59, 1990.
- WENTZ, I.; BORTOLOZZO, L. F. Inseminação artificial em suínos. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SESTI, L. A. C. (Ed.) *Suinocultura Intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho*. Brasília: Embrapa, 1998. p.209-220.