



CAMILA COSTA ABREU

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE *NEOSPORA CANINUM*
EM CAPRINOS MACHOS NATURALMENTE
INFECTADOS**

LAVRAS – MG

2016

CAMILA COSTA ABREU

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE *NEOSPORA CANINUM* EM CAPRINOS MACHOS
NATURALMENTE INFECTADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, para obtenção do título de Doutora.

Orientadora

Dra. Mary Suzan Varaschin

Coorientadora

Dra. Ana Paula Peconick

LAVRAS – MG

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

Abreu, Camila Costa.

Estudo da Distribuição de *Neospora caninum* em Caprinos Machos Naturalmente Infectados / Camila Costa Abreu. – Lavras : UFLA, 2016.

94 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Bibliografia.

1. Encefalite. 2. Miocardite. 3. Miosite. 4. Neosporose. 5. Protozooses. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CAMILA COSTA ABREU

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE *NEOSPORA CANINUM* EM CAPRINOS MACHOS
NATURALMENTE INFECTADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 29 de abril de 2016.

Dra. Ana Paula Peconick (coorientadora) – UFLA

Dra. Angélica Terezinha Barth Wouters – UFLA

Dr. Flademir Wouters – UFLA

Dr. Felipe Pierezan – UFMG

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

**LAVRAS – MG
2016**

*Aos meus pais e ao meu namorado,
porque estiveram sempre ao meu lado, e
por todo o apoio, compreensão, paciência
e acima de tudo amor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar sempre os meus passos e estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Antonio Abreu e M^a Celeste, por me incentivarem com os estudos e pela forte base familiar.

Ao meu amor, William, que soube esperar os seis anos de namoro a distância. Obrigada pelo seu amor, apoio, companheirismo, confiança, amizade e muita paciência.

Aos meus irmãos e a toda família, que estiveram sempre ao meu lado e torceram pelo meu sucesso.

A todos os meus amigos. Pela família que ganhei em Lavras, Kiyoko, Dj, Bibi, Karen e Silas. Obrigada por tudo.

Aos meus mestres. Especialmente a minha orientadora Mary, por todos os anos de amizade, ensinamentos e confiança no meu trabalho. A minha coorientadora, Ana Paula, por sempre ser tão atenciosa ao ajudar com a parte de biologia molecular. Aos meus professores da Patologia, Flademir, Angélica, Dj, Pedro e Josi, agradeço pela oportunidade de ter aprendido com pessoas extremamente competentes, pelo exemplo de dedicação e carinho pelo o que fazem, obrigada pela amizade.

Aos alunos do Setor de Patologia Veterinária, especialmente aos que ajudaram com as cabras. Agradeço em especial à Lízia, aluna de iniciação científica, por todo o auxílio com o projeto.

Aos professores, alunos e funcionários do Biopar, Laboratório de Fisiologia Veterinária, Biotério, Laboratório de Biologia Molecular da Medicina Veterinária Preventiva e da Zootecnia, Laboratório de Anatomia Veterinária, Laboratório de Parasitologia e do Laboratório de Fisiologia Molecular de

Plantas, obrigada por toda a ajuda que precisei em algum momento do doutorado. Foi essencial contar com todos para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Sr. Welson e Rodrigues, pela assistência no laboratório de Patologia. Ao Sr. Francisco, especialmente pela ajuda com as cabras.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelas oportunidades concedidas e pelos onze anos aqui vividos.

Ao Paco, pela orientação no período de doutorado-sanduíche, por ter confiado em meu trabalho e me proporcionar tantas oportunidades. Agradeço ainda a toda equipe do “California Animal Health and Food Safety” de San Bernardino. Apesar de pouco tempo, foi o suficiente para grandes aprendizados e amizades que levarei sempre comigo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e doutorado sanduíche.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

"Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade."

Dalai Lama

RESUMO

A neosporose é uma doença parasitária causada por *Neospora caninum*, responsável por abortos e falhas reprodutivas em caprinos. O objetivo neste estudo foi avaliar a distribuição de *N. caninum* por histopatologia, imunohistoquímica (IHQ) e PCR em diferentes tecidos de caprinos machos fetos, jovens e adultos congenitamente infectados e sem manifestação clínica de neosporose. Os 12 caprinos foram congenitamente infectados por transmissão transplacentária endógena. Lesões microscópicas compatíveis com neosporose foram observadas em musculatura esquelética, coração e sistema nervoso central (SNC). A inflamação linfoplasmocitária foi o achado mais frequente na musculatura esquelética e no miocárdio, algumas vezes associada à calcificação e a macrófagos, além de células gigantes multinucleadas no miocárdio. Pela IHQ foram visualizados cistos na musculatura esquelética de dois fetos e no coração de um macho com quatro meses de idade, taquizoítos foram observados na língua de um dos fetos. As lesões no SNC são compatíveis com neosporose e foram mais acentuadas em um feto e um adulto, a IHQ foi positiva para *N. caninum* em três fetos e dois adultos. Das 171 amostras de tecidos positivas na PCR para *N. caninum*, 73,1% foram de grupos de músculos esqueléticos, coração e sistema nervoso. A maior porcentagem de detecção pela PCR foi observada nos fetos e em dois caprinos jovens e adultos. *N. caninum* teve 5,6 vezes mais chances de estar presente nos tecidos de fetos do que nos de jovens e adultos. Nos fetos, *N. caninum* possuiu predileção por musculatura esquelética em relação ao coração; na musculatura esquelética houve predileção pelos músculos tóraco-abdominais; foram maiores as chances de se detectar DNA de *N. caninum* na musculatura esquelética em relação ao sistema nervoso, reprodutor e demais órgãos (pulmão, fígado, rim, baço, linfonodo mesentérico, timo, adrenal e pele). Os caprinos jovens e adultos tiveram todas as amostras de coração positivas na PCR. Estatisticamente, houve maior chance de *N. caninum* ocorrer no coração em relação a todos os outros tecidos analisados. Maiores foram as chances de *N. caninum* também ocorrer nos músculos esqueléticos em relação ao sistema reprodutor e demais órgãos. Em todos os caprinos, o telencéfalo foi a porção do sistema nervoso com mais resultados positivos pela PCR (58,3%). Os achados obtidos com o presente estudo demonstraram que o DNA de *N. caninum* teve maior chance de ser encontrado nos tecidos de fetos do que nos de jovens e adultos. Os tecidos de eleição para diagnóstico da neosporose foram os da musculatura esquelética, coração e SNC. O sistema reprodutor foi o grupo de tecido com menor índice de amostras positivas na PCR, sugerindo que a transmissão venérea pode não ser importante em caprinos.

Palavras-chave: Encefalite. Miocardite. Miosite. Neosporose. Protozooses.

ABSTRACT

Neosporosis is a parasitic disease caused by *Neospora caninum*, responsible for abortions and reproductive failure in goats. The aim of this study was to evaluate the distribution of *N. caninum* by histopathology, immunohistochemistry (IHC) and PCR in different tissues of male fetuses, young and adult goats congenitally infected and without clinical signs of neosporosis. The 12 goats were congenitally infected by endogenous transplacental transmission. Microscopic lesions compatible with neosporosis were observed in skeletal muscle, heart and central nervous system (CNS). The most frequent finding in skeletal muscle and myocardial was the lymphoplasmacytic inflammation and sometimes it was associated with calcification and macrophages, besides giant cells in the myocardial. Cysts were seen by IHC, in skeletal muscle of two fetuses and in the heart of a four-month-old male, tachyzoites were observed in the tongue of one fetus. The lesions in the CNS are consistent with neosporosis and were more severe in one fetus and one adult, the IHC was positive for *N. caninum* in three fetuses and two adults. Of the 171 PCR positive samples for *N. caninum*, 73.1% were from groups of skeletal muscles, heart and nervous system. The highest percentage of PCR detection was observed in fetuses and in two young and adults goats. *N. caninum* had 5.6 times more chances to be present in fetal tissues than in young and adults. In fetuses, *N. caninum* had predilection for skeletal muscle than the heart; in skeletal muscle there was predilection for thoracoabdominal muscles; it was more likely to detect DNA of *N. caninum* in skeletal muscle than in the nervous and reproductive systems and other organs (lung, liver, kidney, spleen, mesenteric lymph node, thymus, adrenal and skin). Young and adult goats had all heart samples positive in PCR. Statistically, there was a higher chance of *N. caninum* occur in the heart when compared to all other analyzed tissues. Greater were the chances of *N. caninum* also occur in skeletal muscles in relation to the reproductive system and other organs. In all goats, telencephalon was the nervous system portion with more positive results by PCR (58.3%). The findings achieved with this study showed that the *N. caninum* DNA was more likely to be found in fetal tissues than in young and adult goats. The best tissues for diagnosis of neosporosis were the skeletal muscles, heart and CNS. The reproductive system was the tissue group with the lowest rate of positive PCR samples, indicating that venereal transmission may not be important in goats.

Keywords: Encephalitis. Myocarditis. Myositis. Neosporosis. Protozoosis.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

REFERENCIAL TEÓRICO DE *NEOSPORA CANINUM*

Figura 1	Transmissão exógena e endógena de <i>N. caninum</i>	25
Figura 2	Vias de transmissão de <i>N. caninum</i>	26

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Figura 1	Língua, caprino macho, quatro meses de idade, neosporose (Caprino G). Inflamação mononuclear acentuada entre fibras musculares. HE. Barra: 100µm.....	89
Figura 2	Coração, feto caprino macho, neosporose (feto A). Foco de calcificação e inflamação mononuclear associada à célula gigante multinucleada. HE. Barra: 25µm.....	89
Figura 3	Porção lateral do tríceps braquial, feto caprino macho, neosporose (feto A). A: Cisto de <i>Neospora caninum</i> . HE. B: Imuno-histoquímica positiva em cisto de <i>Neospora caninum</i> . Método estreptavidina-biotina-peroxidase, revelação com DAB. Barra: 25µm.....	90
Figura 4	Figura 4 Córtex occipital, feto caprino macho, neosporose (feto B). Gliose associada a necrose, macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas. HE. Barra: 50µm.....	90
Figura 5	Neosporose em caprinos machos. Detecção de <i>N. caninum</i> por PCR. 1: Marcador de peso molecular (100pb). 2: Controle negativo. 3: Controle positivo. 4-16: DNA das amostras de tecidos dos caprinos. Amostras positivas: 4, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15 e 16. Amostras negativas: 5, 6, 10 e 12.....	91

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Tabela 1	Porcentagem de tecidos positivos para <i>Neospora caninum</i> , de acordo com cada animal.....	76
Tabela 2	Músculos avaliados de quatro fetos caprinos machos, congenitamente infectados por <i>Neospora caninum</i> , ocorrência de lesão histológica (miosite), marcação imuno-histoquímica (IHQ) e resultado na pesquisa de <i>N. caninum</i> por PCR.....	77
Tabela 3	Músculos avaliados de quatro caprinos machos, até seis meses de idade, congenitamente infectados por <i>Neospora caninum</i> , ocorrência de lesão histológica (miosite), marcação imuno-histoquímica (IHQ) e resultado na pesquisa de <i>N. caninum</i> por PCR.....	79
Tabela 4	Músculos avaliados de quatro caprinos machos, com mais de seis meses de idade, congenitamente infectados por <i>Neospora caninum</i> , ocorrência de lesão histológica (miosite), marcação imuno-histoquímica (IHQ) e resultado na pesquisa de <i>N. caninum</i> por PCR.....	81
Tabela 5	Áreas do sistema nervoso central avaliadas de quatro fetos caprinos machos, congenitamente infectados por <i>Neospora caninum</i> , ocorrência de lesão histológica.....	83
Tabela 6	Áreas do sistema nervoso central avaliadas de seis caprinos machos, jovens e adultos, congenitamente infectados por <i>Neospora caninum</i> , ocorrência de lesão histológica.....	84

Tabela 7	Porcentagem de amostras positivas para <i>N. caninum</i> na reação de PCR, separadas por grupos de músculos esqueléticos e coração.....	85
Tabela 8	Porcentagem de amostras positivas para <i>N. caninum</i> na reação de PCR, no sistema reprodutor.....	86
Tabela 9	Porcentagem de amostras positivas para <i>N. caninum</i> na reação de PCR, nos demais tecidos.....	87
Tabela 10	Porcentagem de amostras positivas para <i>N. caninum</i> na reação de PCR, separadas por grupos de tecidos.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr/Dra	Doutor(a)
min	Minuto(s)
Obj.	Objetiva
pH	Potencial hidrogeniônico
seg	Segundo(s)
Sr.	Senhor

LISTA DE SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DAB	Diaminobenzidina
dATP	Desoxiadenosina Trifosfatada (do inglês, <i>Deoxyadenosine Triphosphate</i>)
dCTP	Desoxicitidina Trifosfatada (do inglês, <i>Deoxycytidine Triphosphate</i>)
dGTP	Desoxiguanosina Trifosfatada (do inglês, <i>Deoxyguanosine Triphosphate</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleosídeo Trifosfatado (do inglês, <i>Deoxyribonucleoside Triphosphate</i>)
dTTP	Desoxitimidina Trifosfatada (do inglês, <i>Deoxythymidine Triphosphate</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético (do inglês, <i>Ethylenediamine Tetracetic Acid</i>)
ELISA	Teste de Ensaio Imunossorbente Ligado à Enzima (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
HD	Hospedeiro Definitivo
HE	Hematoxilina e Eosina
HI	Hospedeiro Intermediário
IC	Intervalo de confiança
IHQ	Imuno-histoquímica
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>

MG	Minas Gerais
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OR	Relação de probabilidade (do inglês, <i>Odds Ratio</i>)
PB	Paraíba
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RN	Rio Grande do Norte
SNC	Sistema Nervoso Central
SPV	Setor de Patologia Veterinária
TAN	Teste de Aglutinação de <i>Neospora</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
Th1	T auxiliar 1 (do inglês, <i>T helper 1</i>)
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	Estados Unidos da América (do inglês, <i>United States of America</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Símbolo masculino para números ordinais
x	Por; vezes
n	Número; número absoluto
%	Porcentagem; por cento
®	Marca Registrada
™	Marca Registrada (do inglês, <i>Trademark</i>)
Kb	Quilobase
ng	Nanograma
M	Molar
pb	Pares de base
μL	Microlitro(s)
μm	Micrometro(s)
°C	Graus Centígrados
V	Volts
X ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	18
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	<i>Neospora caninum</i>	22
2.1.1	Morfologia.....	22
2.1.2	Hospedeiros, ciclo de vida e formas de transmissão.....	23
2.2	Patogenia e sinais clínicos.....	29
2.3	Diagnóstico.....	33
2.3.1	Testes sorológicos.....	33
2.3.2	Lesões de necropsia e histopatologia.....	33
2.3.3	Imuno-histoquímica.....	37
2.3.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>N. caninum</i> ..	39
2.4	Profilaxia e controle.....	40
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	53
	DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES E DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> EM CAPRINOS MACHOS CONGENITAMENTE INFECTADOS.....	54
1	INTRODUÇÃO.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3	RESULTADOS.....	60
4	DISCUSSÃO.....	65
5	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXOS	
	ANEXO A.....	92
	ANEXO B.....	93
	ANEXO C.....	94

PRIMEIRA PARTE

REFERENCIAL TEÓRICO DE *NEOSPORA CANINUM*

1 INTRODUÇÃO GERAL

A neosporose é uma doença parasitária causada por *Neospora caninum*, um protozoário do filo Apicomplexa, que foi reconhecido pela primeira vez em cães (DUBEY et al., 1988). Desde então, a neosporose tem sido considerada uma importante causa de aborto em bovinos, com graves prejuízos econômicos em todo o mundo (DUBEY; SCHARES, 2011).

No estado de Minas Gerais a infecção por *N. caninum* tem sido demonstrada tanto em estudos de soroprevalência como na forma de doença clínica. Um estudo de soroprevalência, em cães, revelou que 11,4% dos animais foram positivos para *N. caninum*. A maioria dos cães positivos era de áreas rurais sugerindo que, em bovinos de fazendas leiteiras com histórico de aborto, ocorre importante transmissão horizontal de *N. caninum* e que a placenta e os fetos bovinos são importantes fontes do agente para a manutenção da doença na população canina (NOGUEIRA et al., 2013).

Apesar de *N. caninum* ser considerado um importante agente infeccioso, responsável por abortos ou falhas reprodutivas em bovinos de todo o mundo (DUBEY; SCHARES, 2011; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007), sua relevância epidemiológica, clínica e econômica, em pequenos ruminantes, permanece pouco compreendida (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015). Contudo, estudos recentes em pequenos ruminantes sugerem que a neosporose pode ser uma causa de aborto mais importante do que tem sido considerada (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS et al., 2016; MESQUITA et al., 2013; PORTO et al., 2016).

Em rebanhos caprinos foi observada soroprevalência de 10,7% para *N. caninum* e foi demonstrado que cabras soropositivas possuem 3,5 vezes mais chances de abortar do que cabras soronegativas (VARASCHIN et al., 2011). A

doença clínica na forma de abortos e natimortos foi descrita em bovinos (ORLANDO et al., 2013) e caprinos (MESQUITA et al., 2013).

A infecção de vários hospedeiros intermediários (HI) é comum, mas a doença clínica é rara (DUBEY; SCHARES, 2011). Acredita-se que a virulência pode estar relacionada à cepa de *N. caninum*, no entanto, a maior parte desses estudos foi realizada em camundongos, com taquizoítos derivados de cultivo celular (REGIDOR-CERRILLO et al., 2011), o que pode não demonstrar a realidade, pois os isolados de *N. caninum* mantidos *in vitro* por longo tempo podem sofrer alteração em relação à sua virulência e a outras características biológicas (DUBEY; SCHARES, 2011).

Poucos estudos têm sido realizados acerca da patogenia da neosporose. A determinação dos tecidos de HI com maior probabilidade de conter cistos teciduais de *N. caninum* pode ser uma ferramenta importante para o diagnóstico, o entendimento da patogenia e para a adoção de medidas preventivas da neosporose (TOSCAN et al., 2012). Em caprinos machos, jovens e adultos, foram observadas lesões de gliose, manguitos perivasculares e focos de inflamação granulomatosa no sistema nervoso central (SNC), associadas ou não à presença de cistos de *N. caninum*. Tais resultados foram considerados importantes para a participação do macho na epidemiologia da neosporose em rebanhos caprinos (COSTA et al., 2014). Além disso, nos HI podem ser observados cistos parasitários em tecidos além do SNC. A ocorrência de cistos na musculatura esquelética de HI possui grande importância epidemiológica devido ao consumo por predação de caninos, que são os hospedeiros definitivos (PETERS et al., 2001). Em caprinos foi observado, por meio da PCR, DNA de *N. caninum* no diafragma de dois de 181 (1,1%) cabritos abatidos para consumo na Romênia (ŞUTEU et al., 2013). Em cabras naturalmente infectadas foi identificado DNA de *N. caninum* em vários tecidos, com maior positividade em

musculatura esquelética, a qual possui 1,6 vezes mais chance de conter DNA do parasito que outros tecidos/órgãos (NAKAGAKI, 2014). Neste estudo, porém, poucas lesões foram encontradas no SNC, diferente do relatado em caprinos machos (COSTA et al., 2014). Não há estudos que avaliam se o comportamento de *N. caninum* é igual em fêmeas e machos, uma vez que a recrudescência de cistos parasitários durante a gestação é importante para a transmissão vertical da neosporose e reativação da infecção. O comportamento e a distribuição de *N. caninum* em machos ainda não foram estudados, sendo realizados somente poucos estudos sobre a eliminação do agente via sêmen em bovinos (FERRE et al., 2005; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007ab) e ovinos (SYED-HUSSAIN et al., 2013), demonstrando que a contaminação horizontal via sêmen não é importante.

O objetivo neste estudo foi avaliar a distribuição de *N. caninum* por histopatologia, imuno-histoquímica e PCR em diferentes tecidos de caprinos machos fetos, jovens e adultos, congenitamente infectados e sem manifestação clínica de neosporose e comparar a positividade entre os tecidos dos fetos e caprinos adultos para *N. caninum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Neospora caninum*

N. caninum é um parasito pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina e família Sarcocystidae, família que abrange também os gêneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* e *Besnoitia* (DUBEY et al., 1988). Os parasitos da família Sarcocystidae têm ciclo biológico heteroxeno, caracterizado pela formação de cistos teciduais em hospedeiros intermediários (HI) de diferentes espécies animais de sangue quente e pela eliminação de oocistos nas fezes de carnívoros, seus hospedeiros definitivos (HD) (DUBEY et al., 2002).

N. caninum foi observado pela primeira vez como um protozoário causando encefalomielite grave e miosite em cães que não tinham anticorpos para *Toxoplasma gondii* (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Posteriormente, foi isolado e descrito como um novo gênero – *Neospora*; e classificado em uma nova espécie – *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988).

2.1.1 Morfologia

N. caninum pode ser observado nos tecidos de HI, na forma de cistos ou taquizoítos. Os cistos de *N. caninum* são encontrados principalmente no tecido nervoso. Os cistos têm formato arredondado a ovalado, parede espessa de até 4µm, muitas vezes com um contorno ondulado, mas sem saliências. No interior dos cistos teciduais são observados bradizoítos. Estes são alongados, com cerca de 8 x 2µm e um núcleo subterminal característico. Os taquizoítos de *N. caninum* são ovoides, semilunares ou globulares, dependendo do estágio de

divisão, com dimensões de aproximadamente $7 \times 2\mu\text{m}$. Podem estar presentes em diferentes tipos celulares e cada célula hospedeira infectada pode conter vários taquizoítos, os quais estão localizados em um vacúolo parasitóforo desprovido de membrana, no citoplasma da célula hospedeira (DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos podem ser encontrados em diversas células, tais como células do SNC, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, hepatócitos, miócitos e células tubulares renais (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os oocistos eliminados nas fezes dos HD medem cerca de $12 \times 10\mu\text{m}$ e possuem membrana transparente de $0,6$ a $0,8\mu\text{m}$ de espessura. Cada oocisto de *N. caninum* forma dois esporocistos após ser eliminado no ambiente. Cada esporocisto contém quatro esporozoítos alongados com cerca de $6,5 \times 2,0\mu\text{m}$ (DUBEY et al., 2002).

2.1.2 Hospedeiros, ciclo de vida e formas de transmissão

Estudos experimentais têm demonstrado o cão (*Canis lupus familiaris*) (McALLISTER et al., 1998), o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004) como HD de *N. caninum*. Oocistos viáveis foram observados em infecção natural apenas em fezes de cães (BASSO et al., 2009a,b) e em um lobo cinzento (DUBEY et al., 2011). A fonte mais provável de infecção para os carnívoros é a ingestão de tecidos infectados. Teoricamente, tecidos de qualquer animal contendo cistos de *N. caninum* podem ser fonte de infecção para cães (DUBEY; SCHARES, 2011). O número máximo de oocistos que um cão infectado pode eliminar, após alimentar-se de tecidos de HI infectados, é estimado em torno de 500.000 (GONDIM; McALLISTER; GAO, 2005). A frequência de eliminação de oocistos nas fezes de cães parece ser baixa. Em um estudo na Alemanha foram

identificados oocistos em apenas sete de 24.000 amostras de fezes examinadas (SCHARES et al., 2005). Com isso, a taxa de transmissão horizontal do cão para ruminantes é baixa, com menos de 8% de soroconversão, isto é, animais negativos que passam a ser positivos (DIJKSTRA et al., 2003). Porém, a transmissão horizontal pode ser importante em alguns rebanhos de áreas com prevalência elevada (EIRAS et al., 2011). No estado de Minas Gerais foi observada soroprevalência de 11,4% para *N. caninum* em cães, com maior índice de positividade na zona rural; sugestiva de que nos bovinos de fazendas leiteiras com histórico de aborto ocorra importante transmissão horizontal de *N. caninum* e manutenção da infecção na população canina (NOGUEIRA et al., 2013).

Há grande variedade de espécies animais que agem como HI de *N. caninum*, domésticas e selvagens, incluindo bovinos, caprinos, ovinos, equinos, suínos, gatos domésticos, diversas espécies de aves, roedores e lagomorfos, bisões, bubalinos, veados, iaques, camelídeos e lhamas (DUBEY; SCHARES, 2011). No entanto, o maior impacto da neosporose é na bovinocultura, por ser a maior causa de aborto em bovinos, o que acarreta graves prejuízos econômicos em todo o mundo (DUBEY; SCHARES, 2011). Estudos recentes sugerem que a neosporose é uma importante causa de aborto também nos pequenos ruminantes (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS et al., 2016; MESQUITA et al., 2013; PORTO et al., 2016). No sul de Minas Gerais, sabe-se que *N. caninum* é um importante agente associado a casos de aborto em bovinos (ORLANDO et al., 2013) e em caprinos (MESQUITA et al., 2013).

Nos HI a neosporose pode ser transmitida de duas formas; vertical e horizontal. Na infecção vertical o feto pode infectar-se por duas formas transplacentárias; exógena e endógena (Figuras 1 e 2). A transmissão transplacentária exógena ocorre se uma fêmea for infectada durante a gestação pela ingestão de oocistos esporulados. Os esporozoítos diferenciam-se em

taquizoítos com disseminação para o útero, provavelmente pela circulação e em células do sistema fagocítico mononuclear e, finalmente, atravessam a placenta e infectam o feto. A transmissão transplacentária endógena ocorre quando há reativação de uma infecção persistente, já existente durante a gestação. Nesse caso, os bradizoítos (presentes nos cistos teciduais) são reativados e diferenciam-se em taquizoítos, com disseminação para diversos tecidos, inclusive a placenta, alcançando o feto. Para o feto o resultado da infecção exógena ou endógena é o mesmo: pode ocorrer morte fetal ou ele sobreviver e nascer persistentemente infectado. As fêmeas nascidas infectadas passarão a infecção para os seus descendentes (TREES; WILLIAMS, 2005; WILLIAMS et al., 2009). Como em bovinos, a transmissão transplacentária endógena, devida à reativação de infecções latentes durante a gestação, aparenta ser o principal mecanismo pela qual a neosporose é mantida em rebanhos ovinos (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014).

Transmissão transplacentária da neosporose bovina

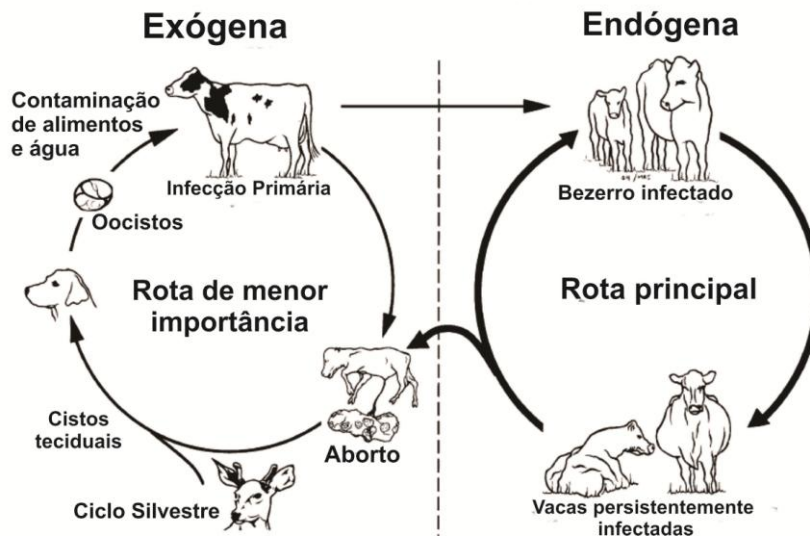


Figura 1 Transmissão exógena e endógena de *N. caninum* (Adaptado de Dubey; Buxton; Wouda, 2006)

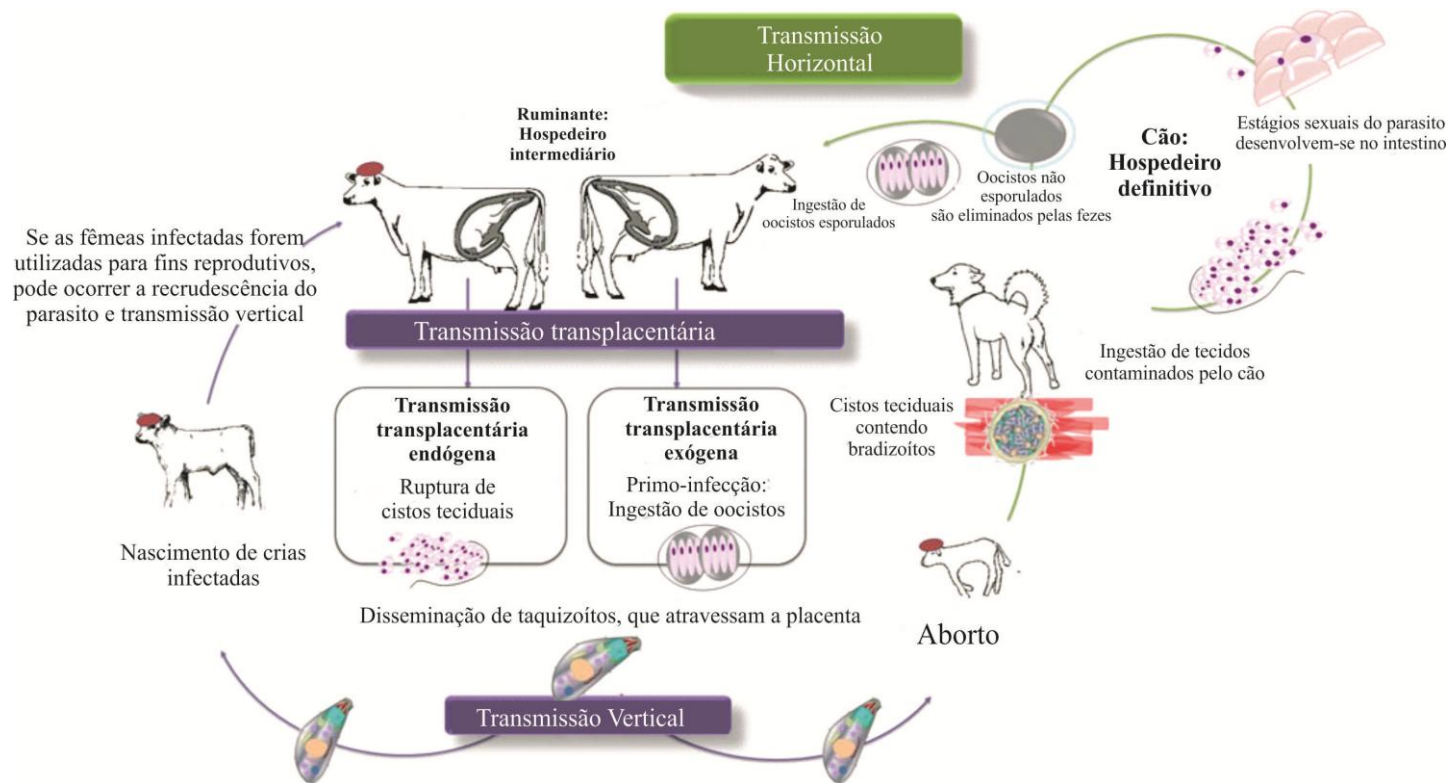


Figura 2 Vias de transmissão de *N. caninum* (Adaptado de Benavides et al., 2014)

A infecção horizontal ocorre após o nascimento. Nesse caso, os HI infectam-se pela ingestão de oocistos esporulados que foram eliminados no ambiente com as fezes dos HD (GONDIM; McALLISTER; GAO, 2005). Nos HI, esporozoítos atingem os mais diversos órgãos através da circulação linfática ou sanguínea e recebem o nome de taquizoítos. Nos órgãos eles se reproduzem com grande rapidez, podendo resultar em focos de necrose. Eventualmente, o parasito pode atingir as glândulas mamárias e ser eliminado pelo leite (GONDIN et al., 1999). Em regiões com alta prevalência da neosporose bovina, nas fazendas em que rebanhos caprinos, ovinos e bovinos dividem pasto e fontes de água, sugere-se que possa haver alguma relação epidemiológica (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014; MORENO et al., 2012).

Não se sabe a frequência com que bovinos são infectados após o nascimento em comparação com os que tiveram infecção transplacentária (WILLIAMS et al., 2009). Mas, sabe-se que, em bovinos, *N. caninum* é um protozoário de infecção eficiente, e tanto a transmissão horizontal como a vertical são consideradas importantes na epidemiologia da neosporose (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Estudos em bovinos demonstraram que a transmissão vertical ou congênita de *N. caninum* é considerada a mais importante e pode ocorrer por diversas gerações (DUBEY; SCHARES, 2011). A transmissão transplacentária de *N. caninum* é também considerada de grande importância em pequenos ruminantes (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS et al., 2016; MORENO et al., 2012; PORTO et al., 2016). Em caprinos naturalmente infectados por *N. caninum*, a taxa de transmissão da mãe para sua progênie foi de 77% (MESQUITA et al., 2013).

Em bovinos, o abortamento causado por *N. caninum* segue dois padrões, epidêmico e endêmico. O padrão de aborto epidêmico está relacionado à transmissão horizontal e o padrão endêmico à vertical (BENAVIDES et al.,

2014). O aborto epidêmico se caracteriza por vacas prenhes em risco, abortando durante um curto período de tempo (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Em contraste, o aborto endêmico persiste no rebanho por vários meses ou anos (BENAVIDES et al., 2014).

Dijkstra et al. (2008), acompanhando um rebanho bovino positivo para neosporose, demonstraram diminuição dos níveis de anticorpos anti-*N. caninum* após três anos de estudo, a maioria dos animais com baixo título de anticorpos tornou-se negativa e alguns animais com títulos altos tiveram diminuição deles.

Em caprinos verificou-se que cabras soropositivas possuem 3,5 vezes mais chances de abortar que cabras soronegativas (VARASCHIN et al., 2011) e, quando há um aumento nos títulos de IgG maternos na segunda metade gestacional, há 10 vezes mais chances de ocorrerem conceptos com infecção congênita (MESQUITA et al., 2013).

A possibilidade de transmissão venérea da neosporose tem sido investigada após ter sido encontrado DNA de *N. caninum* em sêmen e sangue de touros naturalmente (FERRE et al., 2005; ORTEGA-MORA et al., 2003) e experimentalmente infectados (SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007a). Mas, sabe-se que a infecção horizontal, através do sêmen, não é eficiente. Na inoculação intrauterina em novilhas e vacas, com diferentes doses de taquizoítos, houve detecção de IgG específico para *N. caninum* em 10 novilhas (29 novilhas infectadas com diferentes doses), e uma dose alta de taquizoítos no sêmen foi necessária para a soroconversão de apenas uma vaca (28 vacas infectadas com diferentes doses) no experimento (SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007b).

Outros estudos não conseguiram demonstrar a transmissão venérea de infecção por *N. caninum* de touros experimentalmente infectados a novilhas através de inseminação artificial (FERRE et al., 2008) ou monta natural (OSORO et al., 2009). Em carneiros experimentalmente infectados com

taquizoítos houve detecção do DNA de *N. caninum* no sêmen de 11 dos 32 carneiros infectados. Ao realizar acasalamento desses carneiros com ovelhas por monta natural não houve soroconversão em nenhuma delas, sugerindo que a infecção horizontal via sêmen não é uma via importante de transmissão nos ovinos (SYED-HUSSAIN et al., 2013).

Não há evidências de que a infecção por *N. caninum* é zoonótica (DUBEY; SCHARES, 2011). Humanos poderiam tornar-se expostos a *N. caninum* por ingestão acidental de oocistos eliminados nas fezes de HD ou por consumo de carne crua ou mal passada de HI infectados. Evidência sorológica da exposição de humanos por *N. caninum* foi observada (TRANAS et al., 1999). Um estudo realizado na Inglaterra sugere que a neosporose em humanos é pouco provável. No entanto, devido à variação mundial na prevalência da neosporose bovina e às diferenças regionais na incidência da eliminação de oocistos por cães, há necessidade de estudos vigilantes acerca da possibilidade dessa infecção em humanos (McCANN et al., 2008).

2.2 Patogenia e sinais clínicos

Ao atingirem a corrente sanguínea do hospedeiro, os taquizoítos de *N. caninum* podem infectar as células de quase todos os tecidos, mas possuem maior tropismo por células do SNC, da musculatura cardíaca e esquelética, e células endoteliais (BARR et al., 1991), podendo ser observados também em macrófagos, fibroblastos, hepatócitos e células tubulares renais (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os taquizoítos dividem-se rapidamente nas células do HI durante a fase de infecção aguda, induzindo focos de necrose e disseminação da infecção para vários tecidos (MÜLLER et al., 2002). Penetram na célula por invasão ativa em

menos de cinco minutos, localizando-se posteriormente no citoplasma celular, no interior de um vacúolo parasitóforo. Após a ruptura celular, os taquizoítos vão para o meio extracelular e, em poucas horas, iniciam os mecanismos de adesão e invasão de novas células. A destruição celular e a enfermidade dependem da habilidade do taquizoíto em penetrar e multiplicar-se na célula hospedeira e da habilidade do hospedeiro em inibir a multiplicação do parasito (HEMPHILL; GOTTSTEIN; KAUFMANN, 1996).

Danos à placenta materna, causados pelos taquizoítos, podem matar o feto por interrupção do fornecimento de nutrientes e oxigênio (DUBEY et al., 1992). As lesões associadas a *N. caninum* no encéfalo e no coração de fetos abortados podem ser suficientemente severas para matá-lo. Além disso, há evidências de que a infecção por *N. caninum* também estimule a liberação de citocinas pró-inflamatórias e resposta imune tipo Th1 na interface materno-fetal, que pode ser prejudicial para a gestação (INNES et al., 2005). Em cabras, foi observado que existe uma relação entre o aumento dos níveis de IgG, na segunda metade gestacional, e a ocorrência de infecção transplacentária endógena para os fetos. Nesse mesmo estudo, cabras com aumento dos níveis de IgG tiveram dez vezes mais chances de gerar fetos infectados (MESQUITA et al., 2013).

A infecção ao final da gestação tem como resultado o nascimento de bezerros congenitamente infectados, mas clinicamente normais, uma vez que o feto é capaz de desenvolver defesa imunológica competente frente ao patógeno (GONZÁLEZ et al., 1999). Altos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* podem ser demonstrados no soro desses animais (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). Até 95% dos bezerros congenitamente infectados podem nascer clinicamente normais e, apesar da infecção subclínica ser a forma mais frequente da neosporose congênita, também têm sido descritos casos de bezerros

congenitamente infectados que apresentaram manifestação neurológica, como consequência da formação de cistos no SNC (DUBEY; LINDSAY, 1996).

O estudo experimental de Arranz-Solís et al. (2015) em ovinos demonstrou o papel crucial do estágio da gestação no curso da neosporose, em que infecções nos terços inicial e médio de gestação causaram 100% de aborto, enquanto infecção no terço final da gestação resultou em cordeiros infectados nascidos prematuros, fracos ou clinicamente saudáveis. A resposta imune desempenha um papel crucial nos resultados da infecção de *N. caninum* durante a gestação. Sugere-se que o aborto no terço inicial da gestação de ovinos seja causado pela multiplicação incontrolada de *N. caninum* no feto, uma vez que a resposta imune fetal é imatura nessa fase, permitindo ao parasito atravessar a barreira placentária antes da resposta imune maternal ser estabelecida. O aborto no terço médio é provavelmente causado pela grave lesão desenvolvida na placenta. O fato de não ter havido aborto no terço final de gestação pode ser devido ao curto intervalo de tempo entre a inoculação de *N. caninum* e o período de nascimento dos cordeiros e de um sistema imune fetal mais maduro (ARRANZ-SOLÍS et al., 2016).

O estudo semelhante realizado por Porto et al. (2016), em caprinos, resultou em morte fetal em todas as cabras que foram inoculadas durante o primeiro terço gestacional (sete animais). A infecção durante o terço médio (sete animais) gerou morte fetal, um cabrito natimorto e nascimento de cabritos saudáveis clinicamente, mas congenitamente infectados. Os cabritos com inoculação no terço final de gestação (sete animais) nasceram congenitamente infectados, com fraqueza e sinais neurológicos. Nesse mesmo estudo foi observada morte fetal durante a fase aguda da neosporose, algo que não havia sido descrito em ovinos e bovinos.

Os resultados desses estudos sugerem que a infecção por *N. caninum* em cabras e ovelhas no terço final da gestação pode ter tido consequências mais severas que a infecção em bovinos durante o mesmo período (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; BENAVIDES et al., 2012; PORTO et al., 2016).

Em bovinos, caprinos e ovinos, o principal sinal clínico observado na neosporose é o aborto, que pode ocorrer em qualquer época do ano e apresentar-se de forma esporádica, endêmica ou em surtos epidêmicos (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; DUBEY, 2003; PORTO et al., 2016). Nos bovinos, ocorre principalmente entre o quinto e o sétimo mês de gestação e as vacas soropositivas estão mais sujeitas ao abortamento que as soronegativas (DUBEY, 2003).

Aumento transitório na temperatura corporal de vacas e cabras, foi descrito durante a primeira semana após infecção experimental, que é mais provavelmente devida à inoculação dos taquizoítos e os primeiros ciclos de replicação do parasito nos tecidos do hospedeiro (PORTO et al., 2016; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014).

A grande variação no quadro clínico observada nos animais com neosporose congênita está relacionada, provavelmente, com a idade do feto no momento da infecção e o desenvolvimento do seu sistema imune e com a distribuição das lesões no SNC (DUBEY, 2003).

Sinais clínicos foram relatados em bezerros com menos de quatro meses de idade e incluíam sinais neurológicos, incapacidade de levantar-se e manter o peso normal. O exame neurológico pode revelar ataxia, diminuição dos reflexos patelares e perda de propriocepção consciente. Exoftalmia ou assimetria nos olhos pode ser observada (DUBEY; SCHARES, 2006).

Em caprinos há relatos de nascimento de animais fracos, incapazes de alimentar, dificuldade de levantar e manter-se em estação, incoordenação de

membros pélvicos e opistótono (CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; COSTA et al., 2014; PORTO et al., 2016).

2.3 Diagnóstico

2.3.1 Testes sorológicos

A crescente importância da infecção por *N. caninum* nas diferentes espécies domésticas e selvagens tem conduzido ao desenvolvimento de diversas provas indiretas que utilizam extratos antigênicos e antígenos de taquizoítos de *N. caninum* para a detecção de anticorpos (ATKINSON et al., 2000). Testes sorológicos, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação de *Neospora* (TAN) e vários testes do ensaio imunossorbente ligados a enzimas (ELISA), foram desenvolvidos para o diagnóstico em cães, bovinos e outras espécies potencialmente hospedeiras (ATKINSON et al., 2000).

As técnicas indiretas de diagnóstico apresentam sensibilidade e especificidade elevadas. Permitem o diagnóstico da infecção *in vivo* nos animais e o estudo da importância dos hospedeiros no ciclo biológico do parasito ou na epidemiologia da infecção (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

Levantamentos sorológicos têm sido realizados em várias partes do Brasil. A soroprevalência para *N. caninum* obtida nos rebanhos caprinos estudados no sul de Minas Gerais foi de 10,7% (VARASCHIN et al., 2011); 1,05% em caprinos testados no município de Mossoró, RN (LIMA et al., 2008); 3,3% em Patos, PB (FARIA et al., 2007); e 6,34% no estado de São Paulo (FIGLIUOLO et al., 2004).

2.3.2 Lesões de necropsia e histopatologia

Fetos bovinos abortados, na maioria autolisados, raramente apresentam lesões macroscópicas. Porém, pode-se observar mumificação fetal (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003), malformações congênitas, como hidrocefalia e estreitamento do canal vertebral (DUBEY; SCHARES, 2006) e pequenos focos esbranquiçados que se aprofundam na musculatura esquelética e cardíaca, ao corte do tecido (BARR et al., 1991).

Lesões macroscópicas associadas à neosporose são escassas em caprinos, sendo descritos somente hidrocefalia com hipoplasia cerebelar (DUBEY et al., 1996) e um quadro de porencefalia, caracterizado por ausência de substância branca cerebral, com conseqüente dilatação dos ventrículos laterais pela perda tecidual adjacente (hidrocefalia ex-vácuo) (VARASCHIN et al., 2012).

As lesões microscópicas são muito utilizadas no diagnóstico do aborto e/ou infecção por *N. caninum*. Os órgãos de eleição para o diagnóstico histopatológico são encéfalo, coração, fígado (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006) e musculatura esquelética (DUBEY; LINDSAY, 1996).

As lesões histopatológicas induzidas por *N. caninum* em várias espécies animais são caracterizadas por infiltrado inflamatório, composto basicamente por células mononucleares, que pode ser encontrado em todos os órgãos dos fetos abortados (DUBEY; LINDSAY, 1996), associados à necrose multifocal (CORBELLINI et al., 2002).

As lesões mais frequentemente encontradas no SNC são encefalomielite (BOULTON et al., 1995) ou encefalite não supurativa, podendo ser encontrados no infiltrado linfócitos, plasmócitos e macrófagos, de distribuição multifocal, associados ou não a um ou vários focos de gliose, que muitas vezes circundam

os focos de necrose (DUBEY; LINDSAY, 1996; MORENO et al., 2012; VARASCHIN et al., 2012). Estruturas parasitárias podem estar associadas ou distantes da lesão (VARASCHIN et al., 2012). Também podem ocorrer áreas de mineralização no SNC (BOULTON et al., 1995).

Em trabalhos realizados em bezerros foi observado que o hipocampo, o hipotálamo e a amígdala cerebral são, em particular, locais em que existem mais chances de achar o parasito (NISHIMURA et al., 2013). Estruturas de *N. caninum* são raramente encontradas em cortes histológicos de bezerros ou bovinos adultos, mesmo em animais com doença clínica. A ocorrência de *N. caninum* em bezerros de duas semanas de idade com lesões microscópicas de encefalomielite foi observada em apenas um de seis animais que nasceram com sinais neurológicos e que tinham anticorpos anti-*N. caninum* pré-colostrais (De MEERSCHMAN et al., 2005).

Em casos de neosporose congênita nos caprinos, são relatadas lesões principalmente no SNC (CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; COSTA et al., 2014; VARASCHIN et al., 2012). Em fetos caprinos, as principais lesões observadas foram necrose multifocal circundada por células da glia, associadas ou não a manguitos perivasculares e gliose focal sem associação com necrose. Essas lesões predominaram no córtex cerebral, no tálamo e no tronco encefálico e estavam ou não relacionadas a estruturas parasitárias (COSTA et al., 2014).

Em caprinos recém-nascidos também são descritos gliose focal ou focalmente extensa associada a manguitos perivasculares discretos a moderados compostos por linfócitos, plasmócitos e poucos neutrófilos. As lesões foram predominantes no telencéfalo, e na substância cinzenta da medula oblonga. Raras células gigantes multinucleadas foram observadas nas proximidades dos focos inflamatórios, assim como células com aparência de macrófagos

epitelioides associados a cistos teciduais degenerados (CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001). Já em caprinos machos, jovens e adultos, os cistos foram observados em regiões de córtex cerebral, bulbo (ao nível do óbex), colículo rostral e medula espinhal (segmentos cervical, torácico e lombar). Foram encontradas raras células gigantes multinucleadas relacionadas aos focos de gliose, manguitos perivasculares e aos cistos de *N. caninum* (COSTA et al., 2014).

Em ovinos, o encéfalo pode ser o órgão de eleição para o diagnóstico da neosporose em fetos abortados e cordeiros neonatos (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014). Em ovelhas inoculadas experimentalmente durante os três períodos gestacionais, a lesão mais comum em todos os grupos foi encefalite necrosante não supurativa, caracterizada pela distribuição aleatória de focos gliais. Focos de necrose foram, principalmente, observados nos fetos de ovelhas inoculadas nos terços médio e final de gestação (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015). Sabe-se que os níveis de antígenos requeridos para causar lesões no encéfalo são pelo menos dez vezes maiores que aqueles necessários para outros órgãos, e reações inflamatórias requerem mais tempo para se desenvolver no SNC (MATYSZAK, 1998).

Tipicamente, lesões miocárdicas consistem em infiltrado de células mononucleares, com necrose discreta. Lesões hepáticas são caracterizadas por infiltrado periportal de células mononucleares e escassos focos de necrose hepatocelular (CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; DUBEY; SCHARES, 2006). Pode ser observada pneumonia intersticial associada a acúmulo de fluido proteináceo, fibrina e neutrófilos nos espaços alveolares (CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001). Em fetos ovinos experimentalmente infectados foram observados múltiplos focos de necrose com distribuição aleatória em pulmões, coração e musculatura esquelética.

Ocasionalmente, principalmente no coração, esses focos tinham mineralização central. Também foi observada miosite multifocal não supurativa (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015).

Em animais adultos as lesões são discretas ou ausentes (NAKAGAKI, 2014). Sawada et al. (2000) relataram gliose e manguitos perivasculares no SNC, miosite e miocardite focal, além de infiltrado de células mononucleares no fígado e nos rins de uma vaca de dois anos de idade; o diagnóstico de neosporose ocorreu por isolamento do parasito em cultivo celular. Bishop et al. (2010) encontraram meningoencefalite não supurativa aguda e mielite não supurativa moderada no SNC, com descrição de poucas estruturas compatíveis com taquizoítos no endotélio vascular, sem a formação de cistos, em um carneiro de três anos de idade, do qual foi detectado DNA de *N. caninum* por PCR.

Em diversos tecidos do SNC, musculatura esquelética e órgãos internos de cabras observaram-se lesões inflamatórias sugestivas da infecção por protozoários, no entanto, somente 47,8% das cabras foram positivas para *N. caninum* na PCR. Em uma cabra havia estruturas alongadas, compatíveis com taquizoítos no telencéfalo; essa região foi positiva para *N. caninum* na PCR (NAKAGAKI, 2014).

Lesões em placentas de cabras com neosporose caracterizam-se por cotilédones com focos de necrose acentuada, associados à inflamação multifocal composta principalmente por plasmócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, e por vezes, mineralização (MESQUITA, 2012; PORTO et al., 2016).

2.3.3 Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) utilizando anticorpo anti-*N. caninum* tem sido empregada como um método específico e com melhor

sensibilidade para identificação de cistos e taquizoítos em tecidos fetais, quando comparada com a histopatologia, permitindo, assim, estabelecer o diagnóstico definitivo (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003; LINDSAY; DUBEY, 1989). Essa técnica facilita a visualização de estruturas parasitárias nos tecidos, sendo também extremamente importante para o diagnóstico nas fases iniciais e/ou em lesões discretas (CORBELLINI et al., 2002), além de permitir a visualização do agente associado à lesão. Portanto, a IHQ apresenta melhores resultados quando realizada após estudo histopatológico, em que são selecionados fragmentos de SNC e/ou outros tecidos com lesões sugestivas de neosporose (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994).

Uma vez que a manifestação do aborto é mais frequente nas fases mais avançadas da gestação (LÓPEZ-GATIUS; PABÓN; ALMERÍA, 2004) a IHQ permite a visualização precoce do parasito nos tecidos, sendo uma das formas de caracterizar a transmissão congênita de *N. caninum*. É descrita como uma técnica de alta especificidade, porém pouco sensível, podendo resultar em falsos negativos (VAN MAANEN et al., 2004).

São descritos números variáveis de taquizoítos marcados na avaliação por IHQ, mais frequentes no encéfalo e em menor número de casos no miocárdio (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998), já os cistos ocorrem em pequena quantidade no encéfalo e podem não estar associados a lesões (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998; VARASCHIN et al., 2012). Em estudos experimentais em camundongos nude há descrição de taquizoítos em células endoteliais, no estroma do endométrio, no epitélio e em restos celulares de oviduto, ovário, pâncreas, pulmão, encéfalo, estômago, músculo esquelético, intestino, língua, baço, medula espinhal, fígado, rins e coração (SHIBAHARA et al., 1999). Em caprinos, a localização de cistos e taquizoítos, em diferentes regiões do SNC, foi evidenciada pela IHQ em cinco

fetos e em três caprinos machos jovens e adultos (COSTA et al., 2014). Em feto caprino foi observada imunomarcção de taquizoítos entre fibras musculares esqueléticas e do coração (MESQUITA, 2012). Taquizoítos também foram evidenciados pela IHQ em placenta de cabra com neosporose (MESQUITA, 2012).

Estudo experimental em ovelhas demonstrou, através da IHQ, que a infecção por taquizoítos de *N. caninum* no terço inicial de gestação implica em grande quantidade de taquizoítos livres localizados na parte fetal da placenta. Isso poderia ser explicado pela resposta imune fetal ser ainda imatura no terço inicial de gestação, o que permitiria ao parasito atravessar a barreira placentária antes da imunidade materna ser estabelecida, e multiplicar-se nos tecidos fetais sem restrições (ARRANZ-SOLÍS et al., 2016).

2.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *N. caninum*

A eficácia do diagnóstico por PCR depende da conservação da amostra e dos procedimentos de amostragem. A detecção do antígeno de *N. caninum* pela IHQ nas lesões é a melhor evidência para definir a etiologia do aborto. No entanto, a PCR apresenta maior sensibilidade na detecção do DNA de *N. caninum* (DUBEY; SCHARES, 2006).

A viabilização das técnicas de diagnóstico molecular, baseadas na detecção de fragmentos genéticos de *N. caninum* ofereceu, entre outros benefícios, a possibilidade de superar alguns problemas de diagnóstico, principalmente em relação à sensibilidade insuficiente (MEDINA et al., 2006; PAYNE; ELLIS, 1996). Desde meados da década de 1990, várias estratégias foram desenvolvidas nesse sentido, destacando-se as técnicas de sequenciamento de material genômico clonado (MARSH et al., 1995), PCR simples e *nested*

PCR (ELLIS, 1998; PAULA et al., 2004), testes de hibridização de DNA (KAUFMANN et al., 1996; MÜLLER et al, 1996), *multiplex* PCR (MESECK et al., 2005) e *real-time* PCR (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

Como a maior parte do genoma de *N. caninum* ainda não foi sequenciada, praticamente todos os trabalhos que utilizaram PCR para diagnóstico e filogenia partiram de sequências altamente conservadas nos eucariotos, marcadamente a região gênica codificadora de RNA ribossomal ITS-1 (*internal transcribed spacer*) (PAYNE; ELLIS, 1996) e a região denominada de NC-5 (YAMAGE; FLECHTNER; GOTTSTEIN, 1996). A região denominada de ITS-1 é muito empregada atualmente com objetivo diagnóstico, pois essa sequência apresenta-se espécie-específica em relação aos demais parasitos do Filo Apicomplexa e, além disso, normalmente apresenta ampliações consistentes e compatíveis com elevada sensibilidade (OKEOMA et al., 2004).

O tecido cerebral é considerado o mais adequado para a detecção de DNA de *N. caninum* por PCR, seguido por coração, pulmões e rins (DUBEY; SCHARES, 2006).

2.4 Profilaxia e controle

As medidas de prevenção e controle da neosporose podem, muitas vezes, tornarem-se economicamente inviáveis ou pouco práticas. Em rebanhos bovinos, os programas de controle são baseados na diminuição do risco da transmissão horizontal do parasito, principalmente por meio do controle da população de HD, a qual é fonte de contaminação pela excreção de oocistos nas fezes (ORTEGA-MORA; FERNÁNDEZ-GARCÍA; GÓMEZ-BAUTISTA, 2006). Deve-se evitar também que os carnívoros, principalmente de áreas rurais,

alimentem-se de carne ou vísceras cruas, impedindo seu acesso a fetos abortados, membranas fetais, placentas ou natimortos (DIJKSTRA et al., 2002).

São também necessários esforços voltados para a diminuição da transmissão vertical no rebanho, por meio da redução do número de bovinos soropositivos. Nos rebanhos, a transmissão vertical é a principal via, e a recomendação seria não incluir animais soropositivos na reprodução diminuindo, assim, a quantidade de animais soropositivos no rebanho por meio do bloqueio da transmissão vertical. Os animais soropositivos podem ser gradualmente descartados e substituídos por soronegativos (HALL; REICHEL; ELLIS, 2005).

Manejos reprodutivos foram propostos para reduzir as chances e o impacto econômico da transmissão transplacentária endógena no rebanho. A transferência de embriões poderia ser utilizada em vacas infectadas por *N. caninum* para receptoras não infectadas, que gerariam bezerros livres da infecção (MOSKWA et al., 2008)

É importante ressaltar que, de acordo com Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), não é possível aplicar medidas gerais de controle efetivo, uma vez que cada região tem características epidemiológicas específicas para a neosporose. Assim, é prudente observar tais características antes de introduzir um programa de controle da doença.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os achados histopatológicos, IHQ e PCR, os tecidos de eleição para diagnóstico de *N. caninum*, são os de musculatura esquelética, coração e SNC. Pelos resultados da PCR, *N. caninum* tem 5,6 mais chances de ser encontrado nos tecidos de fetos do que nos de adultos. Esses achados de PCR associados aos achados de células gigantes multinucleadas no encéfalo e coração, de alguns caprinos, sugerem que os machos podem progressivamente ficar livres da infecção, uma vez que a reativação de cistos latentes poderia não ocorrer, diferente do que acontece em fêmeas gestantes.

Nos fetos, os resultados da PCR demonstraram que *N. caninum* possui predileção pelos músculos tóraco-abdominais; há predileção por musculatura esquelética em relação ao coração; e são maiores as chances de se detectar DNA de *N. caninum* na musculatura esquelética em relação ao sistema nervoso, sistema reprodutor e demais órgãos.

Nos caprinos jovens e adultos, há maior chance de *N. caninum* ocorrer no coração em relação a todos os outros tecidos analisados; maiores são as chances de *N. caninum* também ocorrer nos músculos esqueléticos em relação ao sistema reprodutor e demais órgãos. Nos 12 caprinos positivos, houve 13,3 mais chances de se encontrar DNA de *N. caninum* no telencéfalo do que nos nervos óptico e trigêmeo; o sistema reprodutor foi o grupo de tecido com menor índice de amostras positivas na PCR, indicando que a transmissão venérea pode não ser importante em caprinos. Este estudo é o primeiro estudo sobre a distribuição de *N. caninum* nos tecidos, incluindo os órgãos do sistema reprodutor de machos fetos, jovens e adultos, contribuindo para o entendimento da patogenia da neosporose em rebanhos caprinos.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-GARCIA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos**. 2003. 279 p. Tese (Doutorado) – Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2003.

ANDERSON, M. L.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 439-461, 1994.

ARRANZ-SOLÍS, D. et al. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. **Veterinary Research**, London, v. 46, p. 19, 2015.

ARRANZ-SOLÍS, D. et al. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. **Veterinary Research**, London, v. 47, p. 2, 2016.

ATKINSON, R. et al. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 110-114, 2000.

BARR, B. C. et al. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 28, n. 2, p. 110-116, 1991.

BASSO, W. et al. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 2, p. 162-166, 2009a.

BASSO, W. et al. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 43-50, 2009b.

BENAVIDES, J. et al. Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what is known and what is needed. **Parasitology**, London, v. 141, n. 11, p. 1471-1488, 2014.

BENAVIDES, J. et al. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. **Veterinary Research**, London, v. 43, p. 83, 2012.

BISHOP, S. et al. The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 1/2, p. 137-142, 2010.

BJERKÅS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BOULTON, J. G. et al. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 72, n. 3, p. 119-120, 1995.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. et al. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 74, n. 4, p. 2491-2494, 2006.

CORBELLINI, L. G.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 13, n. 5, p. 416-419, 2001.

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2002.

COSTA, R. C. et al. Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. **BMC Veterinary Research**, London, v. 10, p. 291, 2014.

DE MEERSCHMAN, F. et al. Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. **Veterinary Record**, London, v. 157, n. 4, p. 115-118, 2005.

DIJKSTRA, T. et al. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 3/4, p. 161-169, 2003.

DIJKSTRA, T. et al. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 3/4, p. 220-225, 2008.

DIJKSTRA, T. et al. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 99-104, 2002.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 134, n. 4, p. 267-289, 2006.

DUBEY, J. P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, p. 382-387, 2011.

DUBEY, J. P. et al. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 201, n. 5, p. 709-713, 1992.

DUBEY, J. P. et al. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 208, n. 2, p. 263-265. 1996.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p. 1-59, 1996.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 1-34, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 1/2, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora Caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

EIRAS, C. et al. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 98, n. 2/3, p. 128-132, 2011.

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

FARIA, E. B. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos City, Paraíba state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 1, p. 126-129, 2007.

FERRE, I. et al. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, p. 1504-1518, 2005.

FERRE, I. et al. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, Los Altos, v. 69, n. 7, p. 905-911, 2008.

FIGLIUOLO, L. P. C. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 29-32, 2004.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 159-161. 2004.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 33-39, 2005.

GONZÁLEZ, L. et al. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, London, v. 144, n. 6, p. 145-150, 1999.

GONZÁLEZ-WARLETA, M. et al. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. **Veterinary Research**, London, v. 45, p. 88, 2014.

HALL, C. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, n. 3/4, p. 231-241, Mar. 2005.

HELMAN, R. G. et al. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 10, n. 3, p. 292-295, 1998.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, London, v. 112, n. 2, p. 183-197, 1996.

INNES, E. A. et al. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 108, n. 1/2, p. 29-36, 2005.

KAUFMANN, H. et al. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 10, n. 4, p. 289-297, 1996.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

LIMA, J. T. R. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 81-86, 2008.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 1981-1983, 1989.

LÓPEZ-GATIUS, F.; PABÓN, M.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, n. 3/4, p. 606-613, 2004.

MARSH, A. E. et al. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 4, p. 530-535, 1995.

MATYSZAK, M. K. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 56, n. 1, p. 19-35, 1998.

McALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

McCANN, C. M. et al. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 6, p. 978-980, 2008.

MEDINA, L. et al. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, n. 3/4, p. 187-191, 2006.

MESECK, E. K. et al. Use of a multiplex polymerase chain reaction to rapidly differentiate *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* in an adult dog with necrotizing myocarditis and myocardial infarct. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 17, n. 6, p. 565-568, 2005.

MESQUITA, L. P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 196, n. 3/4, p. 327-332, 2013.

MESQUITA, L. P. **Transmissão transplacentária de *Neospora caninum* em cabras naturalmente infectadas**. 2012. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MORENO, B. et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, n. 1/2, p. 312-318, 2012.

MOSKWA, B. et al. Studies on *Neospora caninum* DNA detection in the oocytes and embryos collected from infected cows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 158, n. 4, p. 370-375, 2008.

MÜLLER, N. et al. Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 1, p. 252-255, 2002.

MÜLLER, N. et al. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 11, p. 2850-2852, 1996.

NAKAGAKI, K. Y. R. **Estudo da distribuição do *Neospora caninum* em tecidos de cabras naturalmente infectadas**. 2014. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

NISHIMURA, M. et al. Tissue Distribution of *Neospora caninum* in experimentally infected cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 20, n. 2, p. 309-312, 2013.

NOGUEIRA, C. I. et al. Risk factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs from urban and rural areas of milk and coffee production in Minas Gerais state, Brazil. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 141, n. 11, p. 2286-2293, 2013.

OKEOMA, C. M. et al. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 307-315, 2004.

ORLANDO, D. R. et al. Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 11, p. 1332-1338, 2013.

ORTEGA-MORA, L. M. et al. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 301-308, 2003.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. **Acta Parasitológica**, Varsóvia, v. 51, n. 1, p. 1-14, 2006.

- OSORO, K. et al. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 4, p. 639-642, 2009.
- PAULA, V. S. et al. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, n. 7, p. 581-585, 2004.
- PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 347-351, 1996.
- PETERS, M. et al. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.
- PORTO, W. J. N. et al. Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. **Veterinary Research**, London, v. 47, p. 29, 2016.
- REGIDOR-CERRILLO, J. et al. *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. **Veterinary Research**, London, v. 42, p. 41, 2011.
- REGIDOR-CERRILLO, J. et al. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. **Veterinary Research**, London, v. 45, p. 10, 2014.
- SAWADA, M. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 247-252, 2000.
- SCHARES, G. et al. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 14, p. 1525-1537, 2005.

SERRANO-MARTÍNEZ, E. et al. Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p. 1175-1184, 2007a.

SERRANO-MARTÍNEZ, E. et al. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p. 729-737, 2007b.

SHIBAHARA, T. et al. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type Balb/c Mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p. 321-327, 1999.

ȘUTEU, O. et al. Molecular detection of *Neospora caninum* in slaughtered goat kids from Romania. **Scientia parasitológica**, Cluj-Napoca, v. 14, n. 1, p. 43-46, 2013.

SYED-HUSSAIN, S. S. et al. Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 197, n. 3/4, p. 534-542, 2013.

TOSCAN, G. et al. Detecção de ácidos nucleicos em tecidos de gerbils submetidos à infecção aguda por *Neospora caninum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 10, p. 1865-1871, 2012.

TRANAS, J. et al. Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.

VAN MAANEN, C. et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 4, p. 351-364, 2004.

VARASCHIN, M. S. et al. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 50, n. 1, p. 63-67, 2012.

VARASCHIN, M. S. et al. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2011.

WILLIAMS, D. J. L. et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, London, v. 136, n. 14, p. 1895–1900, 2009.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

**DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES E DE *NEOSPORA CANINUM* EM CAPRINOS
MACHOS CONGENTAMENTE INFECTADOS**

RESUMO

A neosporose é uma doença parasitária causada por *Neospora caninum*, responsável por abortos e falhas reprodutivas em caprinos. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição de *N. caninum* por histopatologia, imunohistoquímica (IHQ) e PCR em diferentes tecidos de caprinos machos fetos, jovens e adultos congenitamente infectados e sem manifestação clínica de neosporose. Lesões microscópicas compatíveis com neosporose foram observadas em musculatura esquelética, coração e sistema nervoso central (SNC). A IHQ foi positiva na musculatura esquelética de dois fetos e no coração de um macho jovem, e no SNC em três fetos e dois adultos. Das 171 amostras de tecidos positivas na PCR para *N. caninum*, 73,1% foram de grupos de músculos esqueléticos, coração e sistema nervoso. *N. caninum* tem 5,6 vezes mais chances de estar presente nos tecidos de fetos do que nos de adultos. Nos fetos, *N. caninum* possui predileção por musculatura esquelética em relação ao coração; na musculatura esquelética há predileção pelos músculos tóraco-abdominais; são maiores as chances de se detectar DNA de *N. caninum* na musculatura esquelética em relação aos grupos de tecidos do sistema nervoso, reprodutor e demais órgãos. Os caprinos jovens e adultos tiveram todas as amostras de coração positivas na PCR; há maior chance de *N. caninum* ocorrer no coração em relação a todos os outros tecidos analisados; maiores são as chances de *N. caninum* também ocorrer nos músculos esqueléticos em relação aos grupos de tecidos do sistema reprodutor e demais órgãos. O telencéfalo foi a porção do sistema nervoso com mais resultados positivos pela PCR. Os achados do presente estudo demonstraram que o DNA de *N. caninum* tem maior chance de ser encontrado nos tecidos de fetos do que nos de adultos. Os tecidos de eleição para diagnóstico da neosporose foram músculo esquelético, coração e SNC. O sistema reprodutor foi o grupo de tecido com menor índice de amostras positivas na PCR, sugerindo que a transmissão venérea pode não ser importante em caprinos.

Palavras-chave: Encefalite. Miocardite. Miosite. Neosporose. Protozoose.

1 INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença parasitária causada por *Neospora caninum*, responsável por abortos e falhas reprodutivas em bovinos de todo o mundo (DUBEY; SCHARES, 2011; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). No entanto, sua relevância epidemiológica, clínica e econômica em pequenos ruminantes permanece pouco compreendida (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015). Estudos recentes em pequenos ruminantes sugerem que a neosporose pode ser uma causa de aborto mais importante do que tem sido considerada (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS et al., 2016; MESQUITA et al., 2013; PORTO et al., 2016).

Em rebanhos caprinos do estado de Minas Gerais foi observada soroprevalência de 10,7% para *N. caninum* e foi demonstrado que cabras soropositivas possuem 3,5 vezes mais chances de abortar do que cabras soronegativas (VARASCHIN et al., 2011). A doença clínica na forma de abortos e natimortos foi descrita em bovinos (ORLANDO et al., 2013) e caprinos (MESQUITA et al., 2013).

Poucos estudos têm sido realizados acerca da patogenia da neosporose. A determinação dos tecidos de hospedeiros intermediários (HI) com maior probabilidade de conter cistos teciduais de *N. caninum* pode ser uma ferramenta importante para o diagnóstico, o entendimento da patogenia e para a adoção de medidas para prevenir a neosporose (TOSCAN et al., 2012). Em caprinos machos jovens e adultos foram observadas lesões de gliose, manguitos perivasculares e focos de inflamação granulomatosa no sistema nervoso central (SNC), associadas ou não a cistos de *N. caninum*. Tais resultados foram considerados importantes para a participação do macho na epidemiologia da neosporose em rebanhos caprinos (COSTA et al., 2014). Além disso, nos HI

podem ser observados cistos parasitários em tecidos além do SNC. A ocorrência de cistos na musculatura esquelética de HI possui grande importância epidemiológica devido ao consumo por predação de caninos, que são os hospedeiros definitivos (PETERS et al., 2001). Em caprinos foi observado, por meio da PCR, DNA de *N. caninum* no diafragma de dois de 181 (1,1%) cabritos abatidos para consumo na Romênia (ŞUTEU et al., 2013). Em cabras naturalmente infectadas foi identificado DNA de *N. caninum* em vários tecidos, com maior positividade em musculatura esquelética (NAKAGAKI, 2014) e poucas lesões microscópicas no SNC, diferente do relatado em caprinos machos (COSTA et al., 2014). Não há estudos que avaliam se o comportamento de *N. caninum* é igual em fêmeas e machos, uma vez que a recrudescência de cistos parasitários durante a gestação é importante para a transmissão vertical da neosporose e reativação da infecção. O comportamento e a distribuição de *N. caninum* em machos ainda não foram estudados, havendo somente poucos estudos sobre a eliminação do agente via sêmen em bovinos (FERRE et al., 2005; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007ab) e ovinos (SYED-HUSSAIN et al., 2013), demonstrando que a contaminação horizontal via sêmen não é importante.

O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição de *N. caninum* por histopatologia, imuno-histoquímica e PCR em diferentes tecidos de caprinos machos fetos, jovens e adultos congenitamente infectados e sem manifestação clínica de neosporose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Patologia Veterinária, da Universidade Federal de Lavras (SPV-UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil, mediante aprovação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais desta mesma instituição, sob protocolo n. 081/13 (ANEXO A).

2.1 Animais

Foram utilizados 12 caprinos machos; quatro fetos e oito animais com três meses a três anos de idade (Tabela 1 e ANEXO B), congenitamente infectados por *N. caninum*. Os quatro fetos foram provenientes de duas cabras submetidas a eutanásia no terço final de gestação. As mães e os filhotes foram sorologicamente positivos para *N. caninum* (titulação de 1:50) e negativos para *T. gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), no soro sanguíneo coletado antes da ingestão de colostro. Como controles negativos foram utilizados três caprinos machos (M, N e O, de três, quatro e doze meses de idade, respectivamente, ANEXO B) negativos para *N. caninum* e *T. gondii*. Os animais foram mantidos em baias durante a noite e soltos em piquete telado e isolado durante o dia, com comida e água *ad libitum*. A eutanásia foi obtida por anestesia profunda com tiopental e posterior infusão intravenosa de solução de cloreto de potássio.

2.2 Coleta de materiais para histopatologia, imuno-histoquímica e PCR

Na necropsia foram coletados 58 fragmentos de tecidos de cada caprino para exame histopatológico, imuno-histoquímico (IHQ) e PCR, sendo: a) músculos esqueléticos (n=21) (Tabelas 2-4 e 7); b) miocárdio (Tabelas 2-4 e 7); c) sistema reprodutor (n=13) (Tabela 8); d) sistema nervoso, microscopia

(Tabelas 5 e 6) e PCR (n=8) (Tabela 9); e) sistema digestório (n=7) (Tabela 9); f) demais órgãos (n=8) (Tabela 9).

2.3 Exame histopatológico

Os tecidos foram fixados em formol a 10% tamponado e processados rotineiramente para histopatologia. A pesquisa do parasito e a avaliação de lesões histopatológicas foram realizadas em microscopia ótica. As lesões inflamatórias foram consideradas discretas (até 10 células inflamatórias por campo, obj. 40), moderadas (de 10 a 20 células inflamatórias por campo, obj. 40) e acentuadas (mais de 20 células inflamatórias por campo, obj. 40), (Tabelas 5 e 6).

2.4 Teste de imuno-histoquímica

Os tecidos de todos os caprinos foram submetidos a IHQ, usando o anticorpo primário policlonal anti - *N. caninum* (VMRD, Pullman, USA), na diluição de 1:2200. A recuperação antigênica foi feita por digestão enzimática com tripsina 0,1% (pH 7,8) por 10 min a 37°C, e seguida por calor (micro-ondas, potência máxima) por dois minutos em tampão citrato (pH 6,0) e, para revelação, foi utilizado o cromógeno DAB (3,3 – diaminobenzidina, DAKO) (VARASCHIN et al., 2012). Como controle negativo o anticorpo primário foi substituído por soro homólogo não reagente para *N. caninum* e como controle positivo foram utilizadas amostras de SNC de caprinos contendo cistos de *N. caninum* (VARASCHIN et al., 2012).

2.5 Análise molecular

A extração do DNA celular foi realizada pela técnica de lise por proteinase K (Wizard SV Genomic Purification System, Promega, Madison,

USA). As concentrações (ng/μL) e a qualidade do DNA extraído foram determinadas em espectrofotômetro *NanoVueTM plus* e eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para a detecção de *N. caninum* foram sintetizados iniciadores (Invitrogen) para a amplificação de sequências genéticas do protozoário, tendo como molde o cromossomo IX e dando origem aos *primers forward* TACTTTGTGGTTGCGGGTGT e *reverse* GACGGCTAGGACTCTTCACG, que amplificam um fragmento de 503pb (pares de base), específicos para *N. caninum*.

Os reagentes padrões utilizados para as reações foram: Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase; *set of* dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega, Madison, USA). O volume final das reações foi ajustado para 20 μL utilizando água ultrapura *Milli-Q*, e as condições definidas para a PCR em cada reação foram: 1x Tampão da Taq-polimerase (Green GoTaq Flexi Buffer), 2,5mM MgCl₂, 0,5mM dNTPs, 5U Taq DNA Polimerase, 0,5 μM de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e 100ng da amostra de DNA. Como controle branco, o DNA *template* foi substituído por água ultrapura *Milli-Q* e, como controle positivo, foi utilizada amostra previamente sequenciada do SNC de um caprino naturalmente infectado por *N. caninum*.

As reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) conforme o seguinte protocolo: desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, anelamento de 62° por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min. As amostras foram aplicadas em gel de agarose de alta resolução 1%, coradas com Gel RedTM 1X, na voltagem de 100 V em cuba de eletroforese horizontal, contendo TBE (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M) como tampão de corrida.

Com o auxílio de padrão de peso molecular (Ladder da Ludwig® 100pb ou 1Kb, 250µL) as bandas foram identificadas.

Para confirmação de o fragmento amplificado ser de *N. caninum*, foi feita a purificação do DNA de uma amostra de musculatura esquelética (parte lateral do tríceps braquial) de um caprino sabidamente positivo. O sequenciamento genético foi realizado no sequenciador automático capilar ABI310 (Applied Biosystems) pelo método enzimático descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). Além disso, o *primer* foi testado em uma amostra previamente sequenciada como *T. gondii* positiva, com resultado negativo nesta amostra.

Para análise *in silico*, utilizou-se o programa BlastN (ALTSCHUL et al., 1990), para comparação com as sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no banco de dados do NCBI. A amostra sequenciada, de musculatura esquelética de um caprino macho (ANEXO C), demonstrou 99% (LN714484.1 e FR823385.1) de identidade com *N. caninum*.

2.6 Análise estatística

Para avaliar a existência de tropismo de *N. caninum* por determinados tecidos de caprinos machos naturalmente infectados, foram feitas análises estatísticas por meio de *software EpiInfo* 7.1.3. Os dados foram organizados em tabelas de contingência de dupla entrada (tecidos; positivos ou negativos). E submetidos aos testes de qui-quadrado (X^2). Como medida de associação foram calculadas as razões de possibilidades entre os tecidos e a positividade deles para *N. caninum* e avaliado seu intervalo de confiança a 95%. Considerou-se nível de significância mínimo de 95% em todas as análises estatísticas.

3 RESULTADOS

3.1 *Análise histopatológica e imuno-histoquímica*

Dos 12 caprinos analisados, os achados mais importantes foram observados em musculatura esquelética, coração e SNC.

O principal achado histopatológico em musculatura esquelética e coração foi inflamação linfoplasmocitária, com intensidade discreta a acentuada (Figura 1). Os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos da musculatura esquelética e do coração estão demonstrados nas Tabelas 2-4. Adicionalmente, foi observada calcificação multifocal no miocárdio de dois fetos (A e B), um deles com células gigantes multinucleadas associadas ao infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (A, Figura 2), calcificação no músculo glúteo de um macho com sete meses de idade (I), e no músculo cleido-occipital de um macho com 11 meses (J). Nos controles negativos foi observada inflamação linfoplasmocitária discreta e focal no diafragma do caprino O, e no vasto lateral e glúteo do caprino M.

Os cistos na musculatura esquelética dos fetos A (Figura 3) e C e no coração do caprino G (Tabelas 2 e 3), e de dois grupos de taquizoítos na língua do feto A foram evidenciados pela IHQ.

No SNC, as principais lesões observadas foram necrose, gliose e mangitos perivasculares linfoplasmocitários focais ou multifocais, sendo que, em alguns animais, havia células gigantes multinucleadas associadas à inflamação mononuclear multifocal no telencéfalo (fetos B e D e caprino J) (Figura 4) e ponte (caprino J). As lesões encontradas estão dispostas nas Tabelas 5 e 6. Não foram observadas lesões nos caprinos H e L.

Na IHQ, foram observados cistos em medula lombar, cerebelo e bulbo (caprino J), tálamo (feto D e caprino J), colículo caudal e ponte (feto C) e

telencéfalo (fetos A, C e D). No telencéfalo também foram observados grupos de taquizoítos em dois animais (feto D e caprino E).

Todos os fetos (A, B, C e D) e 50% dos caprinos jovens e adultos (F, J, K e L) apresentaram inflamação linfoplasmocitária discreta nos pulmões, especialmente próxima a vasos. No fígado havia inflamação linfoplasmocitária periportal (caprino I). Nos rins foi observada inflamação linfoplasmocitária discreta em córtex renal (feto C), inflamação linfoplasmocitária acentuada em pelve renal (caprino I) e calcificação focal discreta na região medular (caprinos J, K e L). Não foram observadas estruturas parasitárias pela IHQ.

No sistema reprodutor, foi observada inflamação linfoplasmocitária discreta em plexo pampiniforme (feto C); discreta (caprino G) a moderada (caprino E) no prepúcio, ao redor de glândulas sebáceas; discreta no músculo retrator do pênis (caprinos I e L) e moderada na ampola (caprino K), além de focos de calcificação em ampola (caprino K) e testículo (caprino L). Não foram observadas estruturas parasitárias na IHQ.

Dos três animais controles negativos foi observada inflamação mononuclear discreta em fígado (caprino N e O), pulmão e rim (caprino N), e derme superficial do prepúcio (caprino O).

3.2 Detecção de DNA de *N. caninum* pela PCR

Na PCR (Figura 5) das 490 amostras analisadas, 171 (34,9%) foram positivas para *N. caninum* (Tabela 10). Destas, 98 (57,3%) amostras eram de músculos esqueléticos, sete (4,1%) eram de coração e 20 (11,7%) de sistema nervoso.

Os resultados da PCR nos grupos musculares estão demonstrados nas Tabelas 2-4 e 7. A PCR do sistema reprodutor está representada pela Tabela 8, e a PCR dos sistemas nervoso, digestório e demais órgãos na Tabela 9.

Os maiores índices de identificação do DNA de *N. caninum* nos tecidos foram observados nos fetos A e B, com 69,4% e 64,4% de positividade, respectivamente (Tabela 1). Musculatura esquelética e coração foram os tecidos mais frequentemente positivos na PCR (Tabela 10). Os fetos tiveram 100% de positividade na PCR para os músculos romboide cervical, esplênio, parte lateral do tríceps braquial, infraespinhal, serrátil ventral torácico, grande dorsal e intercostal (Tabelas 2 e 7).

N. caninum tem 5,6 vezes mais chances de estar presente nos tecidos de fetos do que nos adultos ($p=0,00$; OR=5,577; IC 95% [3,722–8,356]).

Verificou-se que, nos fetos, *N. caninum* possui predileção pelos músculos tóraco-abdominais em relação à musculatura da cabeça, porém, não foi possível caracterizar a relação de risco ($p=0,048$; OR=5,4; IC 95% [0,739–61,414]). O mesmo ocorreu ao relacionar a musculatura esquelética com o coração ($p=0,025$; OR=9,315; IC 95% [0,678 – 497,033]). Há mais chances de se encontrar DNA de *N. caninum* na musculatura esquelética em relação ao sistema nervoso ($p=0,000$; OR=6,210; IC 95% [2,478–15,559]), aos tecidos do sistema reprodutor ($p=0,000$; OR=6,210; IC 95% [2,395–16,101]) e demais órgãos ($p=0,043$; OR=2,627; IC 95% [1,011–6,828]).

As amostras de sistema digestório foram 80% positivas nos fetos e 7,7% positivas nos jovens e adultos (Tabela 10); com maior chance de se encontrar DNA de *N. caninum* no sistema digestório dos fetos do que nos jovens e adultos ($p=0,000$; OR=48; IC 95% [6,504–510,199]).

Os caprinos jovens e adultos tiveram 100% de positividade para a detecção de DNA de *N. caninum* no miocárdio (Tabela 10). Pelo teste estatístico, há maior chance de se encontrar DNA de *N. caninum* no coração em relação à musculatura esquelética ($p=0,000$; OR=19,425; IC 95% [2,331–883,030]), assim como em relação ao sistema nervoso ($p=0,000$; OR=27,363; IC

95% [2,837–260,481]), sistema reprodutor ($p=0,000$; OR=60,2; IC 95% [5,257–770,565]), tecidos do sistema digestório ($p=0,000$; OR=58,333; IC 95% [4,214–725,776]), demais órgãos ($p=0,000$; OR=63; IC 95% [4,567–935,518]) e em relação a todos os demais tecidos juntos ($p=0,000$; OR=29,569; IC 95% [3,633–337,774]).

Nos caprinos jovens e adultos, a maior taxa de positividade para musculatura esquelética foi 66,7%, a qual foi observada nos músculos cleido-occipital e diafragma de caprinos com até seis meses de idade (Tabela 3), e no levantador-nasolabial e cleido-occipital de caprinos com mais de seis meses de idade (Tabela 4). Pelo teste estatístico, houve maior chance de se encontrar DNA de *N. caninum* na musculatura esquelética em relação aos tecidos do sistema reprodutor ($p=0,012$; OR=3,722; IC 95% [1,223–15,137]) e em relação aos demais órgãos ($p=0,028$; OR=4,609; IC 95% [1,062–41,632]).

Nos 12 caprinos positivos, houve 13,3 vezes mais chances de se encontrar DNA de *N. caninum* no telencéfalo do que nos nervos óptico e trigêmeo ($p=0,002$; OR=13,3; IC 95% [1,643–153,841]).

Das amostras de pele analisadas, 100% foram positivas nos fetos e nenhuma nos jovens e adultos (Tabela 9). Existe predileção de *N. caninum* pela pele de fetos em relação a dos jovens e adultos, com associação estatisticamente significativa, mas não foi possível caracterizar a relação de risco ($p=0,035$; OR=20; IC 95% [0,601–174,984]).

Não foi detectado DNA de *N. caninum* em vesícula seminal, ampola, glândula bulbouretral, processo uretral (Tabela 8), nervo óptico e adrenal (Tabela 9) de nenhum dos animais.

Ao todo, foram analisadas 616 amostras dos caprinos positivos. Destas, 490 (79,5%) tiveram DNA preservado para o exame de PCR e 126 (20,5%) foram impróprias, devido a degradação do DNA.

Os caprinos controles foram negativos na PCR para *N. caninum*.

4 DISCUSSÃO

Os caprinos adultos deste experimento são provenientes de um rebanho naturalmente infectado por *N. caninum*, mantido em piquete isolado, em acompanhamento desde 2009 (COSTA et al., 2014; MESQUITA, 2012; MESQUITA et al., 2013; NAKAGAKI, 2014), onde todos foram congenitamente infectados por transmissão transplacentária endógena e os fetos foram provenientes de cabras pertencentes a esse rebanho, eutanasiadas no terço final de gestação. A transmissão transplacentária endógena, devida à reativação de infecções latentes durante a gestação, aparenta ser o principal mecanismo pela qual a neosporose é mantida em rebanhos ovinos (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014) e caprinos (MESQUITA et al., 2013). Em caprinos naturalmente infectados por *N. caninum*, a taxa de transmissão da mãe para sua progênie foi de 77% (MESQUITA et al., 2013).

Não foram observados sinais clínicos e lesões macroscópicas nos caprinos deste experimento. A grande variação no quadro clínico descrita nos animais com neosporose congênita está relacionada, provavelmente, com a idade do feto no momento da infecção e o desenvolvimento do seu sistema imune e com a distribuição das lesões no SNC (DUBEY, 2003). Em caprinos há relatos de nascimento de animais fracos, incapazes de alimentar, com dificuldade de levantar e manter-se em estação, incoordenação de membros pélvicos e opistótono (CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; COSTA et al., 2014; PORTO et al., 2016). Lesões macroscópicas associadas à neosporose são escassas em caprinos, sendo descritos somente hidrocefalia com hipoplasia

cerebelar (DUBEY et al., 1996) e um quadro de porencefalia com hidrocefalia ex-vácuo (VARASCHIN et al., 2012).

Lesões microscópicas compatíveis com neosporose foram observadas em musculatura esquelética, coração e SNC. Inflamação linfoplasmocitária foi o achado mais frequente em musculatura esquelética e miocárdio, algumas vezes associada a calcificação e macrófagos, além de células gigantes multinucleadas no miocárdio. Tipicamente, lesões em musculatura esquelética e miocárdio consistem em infiltrado de células mononucleares, com focos variáveis de necrose, por vezes com mineralização central (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; DUBEY; SCHARES, 2006).

Neste estudo, as lesões no SNC são compatíveis com neosporose e foram mais acentuadas no feto A e no adulto J. A IHQ do SNC foi positiva para *N. caninum* em três fetos e dois adultos. Em casos de neosporose congênita nos caprinos, são relatadas necrose, manguitos perivasculares linfoplasmocitários e gliose no SNC. Essas lesões são observadas principalmente em telencéfalo, tálamo, tronco encefálico e medula espinhal. Células gigantes multinucleadas podem ser observadas associadas aos focos inflamatórios e aos cistos de *N. caninum* (CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; COSTA et al., 2014). Estruturas parasitárias podem estar associadas ou distantes da lesão (VARASCHIN et al., 2012). Também podem ocorrer áreas de calcificação no SNC (BOULTON et al., 1995). Sabe-se que os níveis de antígenos requeridos para causar lesões no encéfalo são, pelo menos, dez vezes maiores que aqueles necessários para outros órgãos e reações inflamatórias requerem mais tempo para se desenvolver (MATYSZAK, 1998); isto justificaria a observação de lesões, apesar de menos acentuadas, no SNC dos caprinos adultos.

A IHQ é uma excelente ferramenta de diagnóstico, com alta especificidade, e permite melhor visualização de estruturas parasitárias nos

tecidos; o que facilita o diagnóstico quando as lesões são discretas (BARR et al., 1990; CORBELLINI et al., 2002). Neste estudo foram visualizados cistos na musculatura esquelética de dois fetos e no coração de um macho com quatro meses de idade pela IHQ, os quais estavam, principalmente, na periferia de focos inflamatórios. Taquizoítos foram observados apenas na língua de um dos fetos. Em caprinos, a localização de cistos e taquizoítos em diferentes regiões do SNC foi evidenciada pela IHQ em fetos e em caprinos machos jovens e adultos (COSTA et al., 2014). Em feto caprino foi observada imunomarcagem de taquizoítos entre fibras musculares esqueléticas e do coração (MESQUITA, 2012).

Apesar de não ter sido observada marcação IHQ nos demais tecidos, todos os fetos e quatro machos jovens e adultos apresentaram inflamação mononuclear discreta nos pulmões, próxima a vasos; destes, dois fetos e um adulto foram positivos na PCR. Também foi observada inflamação não supurativa em fígado de um caprino (tecido não positivo na PCR) e rim de um feto (tecido positivo na PCR) e dois adultos (tecidos não positivos na PCR). O fígado é provavelmente o primeiro órgão fetal alcançado pelo parasito através da veia umbilical. Sendo assim, fetos que chegam ao terço final de gestação podem se recuperar das lesões causadas ao fígado (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; BUXTON et al., 1998).

Os caprinos deste estudo foram congenitamente infectados e mantidos em piquete isolado. Portanto, não são esperadas coinfeções por outros protozoários. Pelo fato das manifestações clínicas e as lesões induzidas por *Toxoplasma gondii* e *N. caninum* serem muito semelhantes e os caprinos serem seriamente acometidos pela toxoplasmose (VARASCHIN et al., 2011), o diagnóstico diferencial foi realizado pela IHQ e PCR. Nos caprinos deste experimento não foram observados cistos de *Sarcocystis* sp. Cistos de

Sarcocystis sp. são frequentemente encontrados na musculatura de herbívoros domésticos e têm morfologia bem característica. Nos tecidos dos HI há formação de cistos polizoicos e septados. De acordo com a espécie de *Sarcocystis*, esses cistos tissulares, cujas paredes variam em aparência e estrutura, podem medir até alguns centímetros de comprimento (MONTEIRO, 2011).

Não há estudos avaliando se o comportamento de *N. caninum* é o mesmo em fêmeas e machos. Isso é importante conhecer, uma vez que a recrudescência de cistos parasitários durante a gestação favorece transmissão vertical da neosporose. O comportamento e a distribuição do parasito nos tecidos de machos adultos e jovens ainda não foram estudados e seu conhecimento pode contribuir para a adoção de medidas preventivas para evitar a propagação e a manutenção da neosporose nos rebanhos.

A técnica de PCR, por sua maior sensibilidade (MEDINA et al., 2006; PAYNE; ELLIS, 1996), foi a ferramenta de eleição para a avaliação da distribuição de *N. caninum*. Nos animais em que foram observadas mais lesões e cistos de *N. caninum*, foram detectados mais tecidos positivos na PCR. Das 171 amostras teciduais positivas na PCR para *N. caninum*, 73,1% (125) foram de grupos de músculos esqueléticos, coração e sistema nervoso. A maior porcentagem de detecção pela PCR foi observada nos fetos e em dois caprinos jovens e adultos. Na porcentagem geral os fetos tiveram 59% dos tecidos positivos em comparação a 20,5% dos jovens e adultos. A análise estatística confirmou que *N. caninum* tem 5,6 mais chances de ser encontrada nos tecidos de fetos do que nos de adultos. Estes achados de PCR associados aos achados de células gigantes multinucleadas no encéfalo e miocárdio de alguns caprinos, provavelmente fagocitando cistos degenerados, sugerem que os machos podem progressivamente ficar livres da infecção, uma vez que a reativação de cistos

latentes poderia não ocorrer, diferente do que acontece em fêmeas gestantes (MESQUITA et al., 2013; NAKAGAKI et al., 2014). Dijkstra et al. (2008) acompanhando um rebanho bovino leiteiro positivo para neosporose, demonstraram diminuição dos níveis de anticorpos anti-*N. caninum* após três anos de estudo, pois a maioria dos animais com baixo título de anticorpos tornou-se negativa e alguns animais com títulos altos tiveram diminuição deles.

Nos fetos, os resultados da PCR demonstraram que *N. caninum* possui predileção pelos músculos tóraco-abdominais, quando comparados com a musculatura da cabeça; entre eles, serrátil ventral torácico, grande dorsal e intercostal tiveram 100% de positividade nas amostras testadas. Há predileção estatística de *N. caninum* por musculatura esquelética (75,6% de amostras positivas) em relação ao coração (25% de amostras positivas). São maiores as chances de se detectar DNA de *N. caninum* na musculatura esquelética em relação ao sistema nervoso (33,3% de amostras positivas), sistema reprodutor (33,3% de amostras positivas) e demais órgãos (54,2% de amostras positivas). Estes resultados reforçam os achados descritos em fêmeas caprinas adultas, nas quais foi relatado 1,6 vezes mais chances de ser detectado *N. caninum* na musculatura esquelética que em outros tecidos (NAKAGAKI, 2014).

Na análise estatística das amostras do sistema digestório são maiores as chances de se detectar DNA de *N. caninum* no sistema digestório dos fetos (80% das amostras positivas) do que dos jovens e adultos (7,7% das amostras positivas). Em ruminantes, a circulação sanguínea fetal e maternal é separada, portanto, a infecção da placenta é provavelmente necessária para a infecção fetal (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Através da veia umbilical, o fígado seria o primeiro órgão fetal alcançado pelo parasito (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015), e a partir do fígado, pela circulação sanguínea, os taquizoítos poderiam alcançar qualquer tecido.

Os caprinos jovens e adultos tiveram todas as amostras de coração positivas na PCR. Estatisticamente, houve maior chance de *N. caninum* ocorrer no coração em relação a todos os outros tecidos analisados. Maiores foram as chances de *N. caninum* também ocorrer nos músculos esqueléticos em relação ao sistema reprodutor e demais órgãos, reforçando os resultados descritos por Nakagaki (2014).

Em todos os caprinos analisados, o telencéfalo foi a porção do sistema nervoso com mais resultados positivos pela PCR (58,3%). Porém, a relação estatística foi observada somente quando comparado telencéfalo com nervos óptico e trigêmeo. Em cabras adultas, a medula cervical foi a porção do sistema nervoso com maior positividade pela PCR (NAKAGAKI, 2014).

Há predileção estatística de *N. caninum* ocorrer na pele de fetos (100% das amostras positivas) em relação à pele dos jovens e adultos (nenhuma amostra positiva). Nas cabras, a pele foi o único tecido em que não foi detectado DNA de *N. caninum* (NAKAGAKI, 2014).

O sistema reprodutor foi o grupo de tecido com menor índice de amostras positivas na PCR, quando observada a porcentagem dos doze caprinos. Maior índice de amostras positivas foi observado em músculo retrator do pênis, prepúcio e testículo. Nos jovens e adultos, o DNA de *N. caninum* foi detectado apenas nas amostras de músculo retrator do pênis, prepúcio e próstata. A possibilidade de transmissão venérea da neosporose tem sido investigada após ter sido encontrado DNA de *N. caninum* em sêmen e sangue de touros naturalmente (FERRE et al., 2005; ORTEGA-MORA et al., 2003) e experimentalmente infectados (SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007a). Mas sabe-se que a infecção horizontal, através do sêmen, não é eficiente. Em touros, experimentalmente infectados, não foi possível demonstrar a transmissão venérea de *N. caninum* a novilhas, por inseminação artificial (FERRE et al.,

2008) ou monta natural (OSORO et al., 2009). Em carneiros, experimentalmente infectados com taquizoítos, houve detecção do DNA de *N. caninum* no sêmen de 11 dos 32 carneiros infectados. Ao realizar acasalamento destes carneiros com ovelhas, por monta natural, não houve soroconversão em nenhuma delas, sugerindo que a infecção horizontal via sêmen não é uma via importante de transmissão nos ovinos (SYED-HUSSAIN et al., 2013). Sendo assim, surge o questionamento se o macho caprino poderia, com o passar dos anos, ficar livre da infecção.

5 CONCLUSÕES

Os achados obtidos com o presente estudo demonstraram que o DNA de *N. caninum* tem mais chances de ser encontrado nos tecidos de fetos do que nos de jovens e adultos. Os tecidos de eleição para diagnóstico da neosporose são os da musculatura esquelética, coração e SNC. O sistema reprodutor foi o grupo de tecido com menor índice de amostras positivas na PCR, sugerindo que a transmissão venérea pode não ser importante em caprinos.

Agradecimentos: À FAPEMIG por financiar este estudo e à CAPES pela bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ARRANZ-SOLÍS, D. et al. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. **Veterinary Research**, London, v. 46, n. 19, 2015.
- ARRANZ-SOLÍS, D. et al. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. **Veterinary Research**, London, v. 47, n. 2, 2016.
- BARR, B.C. et al. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 28, n. 2, p. 110-116, 1991.
- BOULTON, J.G. et al. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 72, n. 3, p. 119-120, 1995.
- BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary Research**, London, v. 29, n. 3-4, p. 289-310, 1998.
- CORBELLINI, L.G.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 13, n. 5, p. 416-419, 2001.
- CORBELLINI, L.G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.103, n. 3, p.195-202, 2002.
- COSTA, R.C. et al. Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. **BMC Veterinary Research**, London, v. 10, n. 291, 2014.

- DIJKSTRA, T. et al. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.152, n. 3-4, p. 2008, 220-225, 2008.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v.41, n. 1, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 134, n. 4, p. 267-289, 2006.
- DUBEY, J.P. et al. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 208, n. 2, p. 263-265. 1996.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 1-34, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, 2011.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora Caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- FERRE, I. et al. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, p. 1504-1518, 2005.
- FERRE, I. et al. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, Los Altos, v. 69, n. 7, p. 905-911, 2008.
- GONZÁLEZ-WARLETA, M. et al. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. **Veterinary Research**, London, v. 45, n. 88, 2014.
- MATYSZAK, M.K. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 56, n. 1, p. 19-35, 1998.

MEDINA, L. et al. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.136, n. 3-4, p.187-191, 2006.

MESQUITA, L.P. **Transmissão transplacentária de *Neospora caninum* em cabras naturalmente infectadas**. 2012. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2012.

MESQUITA, L.P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 196, n. 3-4, p. 327-332, 2013.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca. 2011. 356p.

NAKAGAKI, K.Y.R. **Estudo da distribuição do *Neospora caninum* em tecidos de cabras naturalmente infectadas**. 2014. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2014.

ORLANDO, D.R. et al. Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 11, p. 1332-1338, 2013.

ORTEGA-MORA, L.M. et al. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 301-308, 2003.

OSORO, K. et al. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 4, p. 639-642, 2009.

PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.26, n. 4, p.347-351, 1996.

PETERS, M.. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.

PORTO, W.J.N. et al. Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. **Veterinary Research**, London, v. 47, n. 29, 2016.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SERRANO-MARTÍNEZ, E. et al. Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p. 1175-1184, 2007a.

SERRANO-MARTÍNEZ, E. et al. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p. 729-737, 2007b.

ŞUTEU, O. et al. Molecular detection of *Neospora caninum* in slaughtered goat kids from Romania. **Scientia parasitológica**, Cluj-Napoca, v. 14, n. 1, p. 43-46, 2013.

SYED-HUSSAIN, S.S. et al. Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 197, n. 3-4, p. 534-542, 2013.

TOSCAN, G. et al. Detecção de ácidos nucleicos em tecidos de gerbils submetidos à infecção aguda por *Neospora caninum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 10, p. 1865-1871, 2012.

VARASCHIN, M.S. et al. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2011.

VARASCHIN, M.S. et al. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 50, n. 1, p. 63-67, 2012.

Tabela 1 Porcentagem de tecidos positivos para *Neospora caninum*, de acordo com cada animal.

Caprino	Idade	Total de tecidos analisados	Tecidos positivos na PCR (%)
A	Feto	49	69,4
B	Feto	45	64,4
C	Feto	41	58,5
D	Feto	48	43,8
E	3 meses	45	20
F	3 meses	25	4
G	4 meses	52	44,2
H	5 meses	41	4,9
I	7 meses	24	12,5
J	11 meses	39	38,5
K	12 meses	32	18,8
L	36 meses	49	8,2

Tabela 2 Músculos avaliados de quatro fetos caprinos machos, congenitamente infectados por *Neospora caninum*, ocorrência de lesão histológica (miosite), marcação imuno-histoquímica (IHQ) e resultado na pesquisa de *N. caninum* por PCR.

Músculos esqueléticos		Fetos machos												PCR (%)
		Miosite	A IHQ*	PCR	Miosite	B IHQ	PCR	Miosite	C IHQ*	PCR	Miosite	D IHQ	PCR	
Cabeça	Levador nasolabial	-		-	+	-	+	-	-	+	-		-	50
	Zigomático	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	75
	Masseter	-		-	++	-	+	-	-	+	-		-	50
	Língua	+++	7	+	+	-	-	+	-	+	+++	-	+	75
Pescoço	Cleido-occipital	-		-	-	-	+	-	-	+	-		-	50
	Romboide cervical	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	Deg	100
	Esplênio	++	-	+	++	-	+	-	-	+	-	-	Deg	100
	Omo-hioideo	++	-	+	-	-	+	-	-	+	-		-	75
Membros torácicos	Parte lateral do tríceps braquial	+	10	+	-	-	+	-	-	+	+	-	Deg	100
	Supraespinhal	+++	3	+	-		-	+	-	-	+++	-	-	25
	Infraespinhal	++	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	100
	Vasto lateral	+++	7	+	++	-	+	+	2	Deg	-		-	66,7
Membros pélvicos	Tensor da fâscia lata	+	4	+	-	-	+	-	-	+	-		-	75
	Semitendíneo	++	-	Deg	-	-	Deg	-	-	+	-		-	50
	Semimembranáceo	-	1	+	++	-	+	++	-	+	-		-	75
	Glúteo	+	2	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	75

Tabela 2, conclusão

Músculos esqueléticos	Fetos machos												PCR (%)	
	Miosite	A IHQ*	PCR	Miosite	B IHQ	PCR	Miosite	C IHQ	PCR	Miosite	D IHQ	PCR		
Tóraco- abdominais	Serrátil ventral torácico	+	2	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	100
	Grande dorsal			+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	100
	Intercostal	-	1	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	100
	Obliquo externo do abdômen	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	75
	Diafragma	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	75
Coração	++	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	25

*Número de cistos observados na IHQ; Deg: DNA degradado; + positivo; - negativo; Espaço em branco: não realizado. A miosite foi graduada em: -sem inflamação, +discreta, ++ moderada, +++acentuada.

Tabela 3 Músculos avaliados de quatro caprinos machos, até seis meses de idade, congenitamente infectados por *Neospora caninum*, ocorrência de lesão histológica (miosite), marcação imuno-histoquímica (IHQ) e resultado na pesquisa de *N. caninum* por PCR.

Músculos esqueléticos		Caprinos machos até seis meses de idade												PCR (%)
		E			F			G			H			
		Miosite	IHQ	PCR	Miosite	IHQ	PCR	Miosite	IHQ	PCR	Miosite	IHQ	PCR	
Cabeça	Levantador nasolabial	-		-	-	-	Deg	-	-	+	+	-	-	33,3
	Zigomático	-		-	-	-	Deg	-	-	-	-	-	-	0
	Masseter	-		-	-	-	Deg	+	-	-	-	-	-	0
	Língua	++	-	-	-	-	Deg	++	-	+	-	-	-	33,3
Pescoço	Cleido-occipital	-	-	+	-	-	Deg	-	-	+	-	-	-	66,7
	Romboide cervical	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	50
	Esplênio	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	25
	Omo-hioideo	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	50
Membros torácicos	Parte lateral do tríceps braquial	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	25
	Supraespinal	-		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	25
	Infraespinal	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0
	Vasto lateral	-		-	-	-	Deg			+	+	-	-	33,3
Membros pélvicos	Tensor da fáscia lata	-		-	-	-	Deg	+	-	+	-	-	-	33,3
	Semitendíneo	-		-	-	-	Deg	-	-	+	-	-	-	33,3
	Semimembranáceo	-		-	-	-	Deg	+	-	+	-	-	-	33,3
	Glúteo	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0

Tabela 3, conclusão

Músculos esqueléticos	Caprinos machos até seis meses de idade												PCR (%)	
	Miosite	E IHQ	PCR	Miosite	F IHQ	PCR	Miosite	G IHQ*	PCR	Miosite	H IHQ	PCR		
Serrátil ventral	++	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	25
Tóraco-abdominais														
Grande dorsal	-		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	25
Intercostal	-		-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	25
Obliquo externo do abdômen	-		-	-	-	Deg	+	-	+	-	-	-	-	33,3
Diafragma	-	-	+	-	-	Deg	+	-	+	-	-	-	-	66,7
Coração	-	-	+	+	-	Deg	++	3	+	-	-	-	+	100

*Número de cistos observados na IHQ; Deg: DNA degradado; + positivo; - negativo; Espaço em branco: não realizado. A miosite foi graduada em: -sem inflamação, +discreta, ++ moderada, +++acentuada.

Tabela 4 Músculos avaliados de quatro caprinos machos, com mais de seis meses de idade, congenitamente infectados por *Neospora caninum*, ocorrência de lesão histológica (miosite), marcação imuno-histoquímica (IHQ) e resultado na pesquisa de *N. caninum* por PCR.

Músculos esqueléticos		Caprinos machos com mais de seis meses de idade												PCR (%)
		I			J			K			L			
		Miosite	IHQ	PCR	Miosite	IHQ	PCR	Miosite	IHQ	PCR	Miosite	IHQ	PCR	
Cabeça	Levantador nasolabial	+	-	Deg			+			-	-	-	+	66,7
	Zigomático	-	-	Deg	-	-	-	-		-	-		-	0
	Maseter	-	-	Deg	++	-	-	-		-	-		-	0
Pescoço	Língua	-	-	Deg	-	-	-	++	-	-	-		-	0
	Cleido-occipital	-	-	Deg	+	-	+	-		-	-		+	66,7
	Romboide cervical	++	-	-	+	-	+	-		-	-		-	25
	Esplênio	+	-	-	+	-	-	-		-	-		-	0
	Omo-hioideo	-		-	+	-	+	-		-	-		-	25
Membros torácicos	Parte lateral do tríceps braquial	-		-	+	-	+	-		-	-		-	25
	Supraespinhal	-		-	-	-	+	-	-	+	-		-	50
	Infraespinhal	-		-	-	-	+	-		-	-		-	25
	Vasto lateral	+	-	-	+	-	-	-		-	-		-	0
Membros pélvicos	Tensor da fáscia lata	-		-	-	-	-	-		-	-		-	0
	Semitendíneo	-		-	-	-	-	-		-	+		-	25
	Semimembranáceo	-		-	-	-	-	-		-	+		-	25
	Glúteo	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-		-	50

Tabela 4, conclusão

Músculos esqueléticos		Caprinos machos com mais de seis meses de idade											PCR (%)	
		Miosite	I IHQ	PCR	Miosite	J IHQ	PCR	Miosite	K IHQ	PCR	Miosite	L IHQ		PCR
	Serrátil ventral torácico	-		-	-	-	-	-	-	Deg	-		-	0
Tóraco-abdominais	Grande dorsal	-	-	+	+	-	-	-		-	-	-	-	25
	Intercostal	-	-	Deg	+	-	+	-		-	-		-	33,3
	Obliquo externo do abdômen	-	-	+	+	-	+	-		-	-	-	-	50
	Diafragma	+	-	Deg	+	-	-	-		-	-	-	-	0
	Coração	-	-	Deg	+	-	+	-	-	+	-	-	+	100

*Número de cistos observados na IHQ; Deg: DNA degradado; + positivo; - negativo; Espaço em branco: não realizado. A miosite foi graduada em: -sem inflamação, +discreta, ++ moderada, +++acentuada.

Tabela 5 Áreas do sistema nervoso central avaliadas de quatro fetos caprinos machos congenitamente infectados por *N. caninum*, ocorrência de lesão histológica.

Área do SNC	Fetos caprinos machos														
	A					B				C		D			
	MP	G	Nec	Calc	Men	MP	G	Nec.	CG	MP	G	MP	G	CG	
ME cerv	++	+													
ME tor	+					+	+					++			
ME lomb	+	+++		+											
Cerebelo											+				
Tálamo							+						+		
Telencéfalo	++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	++	+	
Col. caudal	+	+++	+										+		
Col. rostral		++					+								

SNC: sistema nervoso central; MP: manguito perivascular; G: gliose; Nec: necrose; Calc: calcificação; Men: meningite; CG: células gigantes multinucleadas; ME: medula espinhal; cerv: cervical; tor: torácica; lomb: lombar; Col.: colículo

Tabela 6 Áreas do sistema nervoso central avaliadas de seis caprinos machos, jovens e adultos, congenitamente infectados por *N. caninum*, ocorrência de lesão histológica.

Área do SNC	Caprinos jovens e adultos													
	E		F		G		I				J		K	
	MP	G	MP	MP	G	MP	G	MP	G	Nec.	Calc	Men	CG	G
ME tor.				+	+									
ME lomb.								++	+					
Cerebelo								++	+			+		
Tálamo						+		+	++					
Telencéfalo	+	+	+			+++	+	++	++	++		+	+	+
Bulbo								++	+					
Ponte								+	+				+	
Col. caudal	+													
Col. rostral								+	++					

SNC: sistema nervoso central; MP: manguito perivascular; G: gliose; Nec: necrose; Calc: calcificação; Men: meningite; CG: células gigantes multinucleadas; ME: medula espinhal; tor: torácica; lomb: lombar; Col.: colículo

Tabela 7 Porcentagem de amostras positivas para *N. caninum* na reação de PCR, separadas por grupos de músculos esqueléticos e coração.

Grupos de músculos esqueléticos	Músculo esquelético	Total de amostras		PCR positivas (%)		Total PCR positivas (%)
		Fetos	Jovens e Adultos	Fetos	Jovens e Adultos	
Cabeça	Levantador nasolabial	4	6	50	50	50
	Zigomático	4	6	75	0	30
	Masseter	4	6	50	0	20
Pescoço	Língua	4	6	75	16,7	40
	Cleido-occipital	4	6	50	66,7	60
	Romboide cervical	3	8	100	37,5	54,5
	Esplênio	3	8	100	12,5	36,4
Membros torácicos	Omo-hioideo	4	8	75	37,5	50
	Parte lateral do tríceps braquial	3	8	100	25	45,5
	Supraespinhal	4	8	25	37,5	33,3
	Infraespinhal	4	8	100	12,5	41,7
Membros pélvicos	Vasto lateral	3	7	66,7	14,3	30
	Tensor da fáscia lata	4	7	75	14,3	36,4
	Semitendíneo	2	7	50	28,6	33,3
	Semimembranáceo	4	7	75	28,6	45,5
Tóraco-abdominais	Glúteo	4	8	75	25	41,7
	Serrátil ventral torácico	4	7	100	14,3	45,5
	Grande dorsal	4	8	100	25	50
	Intercostal	4	7	100	28,6	54,5
	Obliquo externo do abdômen	4	7	75	42,9	54,5
	Diafragma	4	6	75	33,3	50
	Coração	4	6	25	100	70

Tabela 8 Porcentagem de amostras positivas para *N. caninum* na reação de PCR, no sistema reprodutor.

Sistema reprodutor masculino	Total de amostras		PCR positivas (%)		Total PCR positivas (%)
	Fetos	Jovens e adultos	Fetos	Jovens e adultos	
M. retrator do pênis	0	4	0	50	50
Testículo	4	3	50	0	28,6
Prepúcio	4	2	50	50	50
Próstata	0	4	0	25	25
Vesícula seminal	0	4	0	0	0
Ampola	0	3	0	0	0
Glândula bulbouretral	0	3	0	0	0
Pênis	3	6	33,3	0	11,1
Cauda do epidídimo	4	3	25	0	14,3
Corpo do epidídimo	4	5	25	0	11,1
Cabeça do epidídimo	4	4	25	0	12,5
Plexo pampiniforme	4	4	25	0	12,5
Processo uretral	0	1	0	0	0

Tabela 9 Porcentagem de amostras positivas para *N. caninum* na reação de PCR, nos demais tecidos.

Grupos de tecidos	Tecido	Total de amostras		PCR positivas (%)		Total PCR positivas (%)
		Fetos	Jovens e Adultos	Fetos	Jovens e Adultos	
Sistema Nervoso	Med. esp. cervical	3	3	0	33,3	16,7
	Med. esp. torácica	4	6	25	16,7	20
	Med. esp. lombar	4	6	50	16,7	30
	Cerebelo	4	7	25	14,3	18,2
	Tálamo	4	8	50	12,5	25
	Telencéfalo	4	8	75	50	58,3
	Nervo óptico	3	7	0	0	0
	Nervo trigêmeo	4	7	25	14,3	18,2
	Intestino delgado	2	3	100	33,3	60
Sistema digestório	Válvula íleo-cecal	3	2	66,7	0	40
	Rúmen	3	4	33,3	0	14,3
	Retículo	3	4	66,7	0	28,6
	Omaso	3	4	100	0	42,9
	Abomaso	2	4	100	0	33,3
	Esôfago	4	5	100	20	55,6
	Pulmão	4	7	50	14,3	27,3
	Fígado	4	6	25	0	10
	Rim	3	5	100	0	37,5
Demais órgãos	Baço	3	3	33,3	33,3	33,3
	Linfonodo mesentérico	2	3	100	0	40
	Timo	2	0	50	0	50
	Adrenal	3	0	0	0	0
	Pele	3	4	100	0	42,9

Tabela 10 Porcentagem de amostras positivas para *N. caninum* na reação de PCR, separadas por grupos de tecidos.

Grupos de tecidos	Total de amostras		PCR positivas (%)		Total PCR positivas (%)
	Fetos	Jovens e Adultos	Fetos	Jovens e Adultos	
Músculos esqueléticos	78	149	75,6	26,2	43,2
Coração	4	6	25	100	70
Sistema nervoso	30	52	33,3	19,2	24,4
Sistema reprodutor	27	46	33,3	8,7	17,8
Sistema digestório	20	26	80	7,7	39,1
Demais órgãos	24	28	54,2	7,1	28,8
Total	183	307	59	20,5	34,9

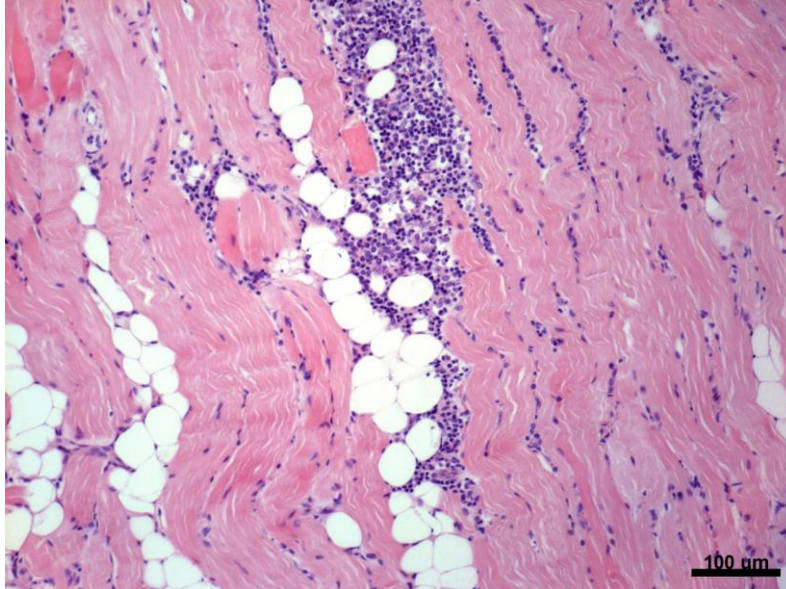


Figura 1 Língua, caprino macho, quatro meses de idade, neosporose (Caprino G). Inflamação mononuclear acentuada entre fibras musculares. HE. Barra: 100 μ m.

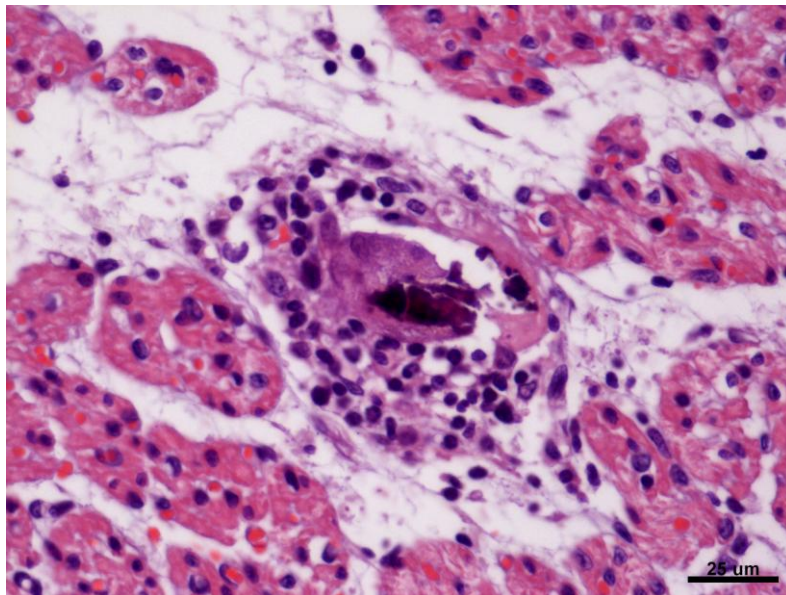


Figura 2 Coração, feto caprino macho, neosporose (feto A). Foco de calcificação e inflamação mononuclear associada à célula gigante multinucleada. HE. Barra: 25 μ m.

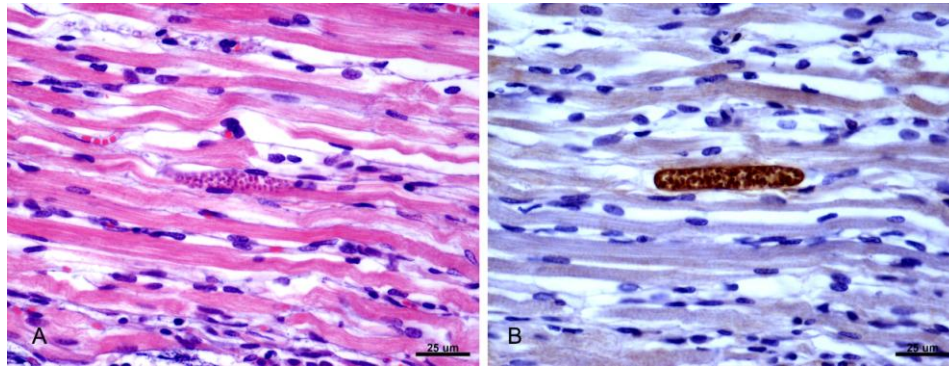


Figura 3 Porção lateral do tríceps braquial, feto caprino macho, neosporose (feto A). A: Cisto de *Neospora caninum*. HE. B: Imuno-histoquímica positiva em cisto de *Neospora caninum*. Método estreptavidina-biotina-peroxidase, revelação com DAB. Barra: 25µm.

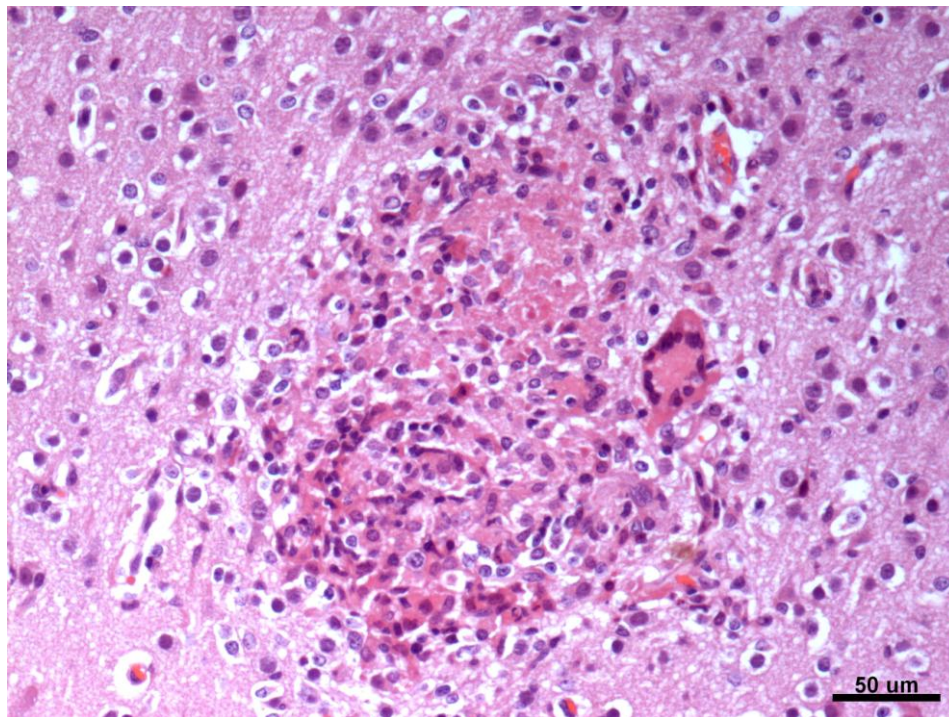


Figura 4 Córtex occipital, feto caprino macho, neosporose (feto B). Gliose associada a necrose, macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas. HE. Barra: 50µm.

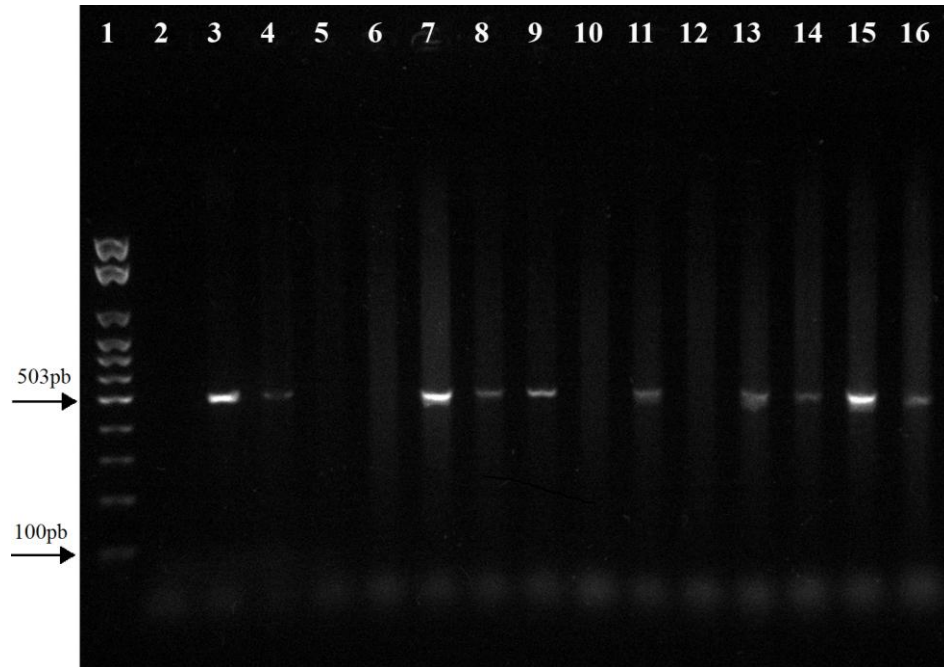


Figura 5 Neosporose em caprinos machos. Detecção de *N. caninum* por PCR. 1: Marcador de peso molecular (100pb). 2: Controle negativo. 3: Controle positivo. 4-16: DNA das amostras de tecidos dos caprinos. Amostras positivas: 4, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15 e 16. Amostras negativas: 5, 6, 10 e 12.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 081/13, relativo ao projeto intitulado Caracterização de eventos imunopatológicos em placenta e sistema nervoso central de caprinos e bovinos naturalmente infectados por *Neospora caninum*, que tem como responsável Mary Suzan Varaschin está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), tendo sido aprovado na reunião de 30/01/2014.

Início do projeto:30/01/2014 - Término do projeto:31/12/2015

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 081/13, related to the project entitled "Characterization of immunopathological events in placenta and central nervous system of goats and cattle naturally infected by *Neospora caninum*.", under the supervision of Mary Suzan Varaschin, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the Institutional Animal Care and Use Committee (Standing Committees/PRP-UFLA), and was approved in January 30, 2014.

Project's beginning:30/01/2014 - Project's end:31/12/2015

Lavras, 30 de janeiro de 2014

Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

ANEXO B

Identificação dos caprinos utilizados no experimento.

Animais	Identificação	Caprino	Idade
Positivos para <i>N. caninum</i>	A	D feto Brisa	Feto
	B	B feto Brisa	Feto
	C	G feto Amy	Feto
	D	E feto Amy	Feto
	E	I Filhote Debrita	3 meses
	F	S Shreck	3 meses
	G	Z Frezé	4 meses
	H	F Francisco	5 meses
	I	V Vítor	7 meses
	J	P Pingo	11 meses
	K	X Xassi	12 meses
Controles negativos	L	C Chiquinho	36 meses
	M	J Ivam	3 meses
	N	K Honório	4 meses
	O	H Lino	12 meses

ANEXO C

Sequência da amostra de musculatura esquelética (porção lateral do tríceps braquial) do caprino J, que será depositada no banco de dados do NCBI.

```
CGGTCAGTATCAGTACTCTCTGGATTACTTCACGCGCATCTTCCGCGA  
AAGCCTCAAGCGCATCTCCGCAGACGATGCCTCTCTGCAAACCGCC  
TGCAGGCTCTCGTGGATGGCGCCACCGAAATGCTCTTTGCCAGTGTC  
GCCTGAGGTCTGTTTCACCAACACAAATTGCTGCTCGCCTTCCTTCTC  
GCTGTGGAAGTCGTCCGGCAAGAGCGCCGGGAGTTCACCACGAGG  
TAAGCCGCCACGCGCGAAGAGAAAGATTTCCACCTCGAGCGAAACG  
GGAATCGGAAGGGAGGGTGCAGGGCATGCACGTGGAAAGATGTCAT  
TCACGTGTGGAGTTTACGCGGGGAATCAAAGGCTTAGATGGGCATGT  
ACAGGTGACCGCTTTTCATGCTTCTGCGGTCGCTTTCAGGGACCACTT  
TTGCCTGACCCGAAAAGTAATGCATCTCCGTGAAGAGTCCTAGCCGT  
CA
```