



DÉBORA RIBEIRO ORLANDO

**EVENTOS PATOLÓGICOS EM PLACENTA E
SORO DE CABRAS NATURALMENTE
INFECTADAS POR *Neospora caninum***

LAVRAS - MG

2017

DÉBORA RIBEIRO ORLANDO

**EVENTOS PATOLÓGICOS EM PLACENTA E SORO DE CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS POR *Neospora caninum***

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 a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

Profa. Dra. Ana Paula Peconick
Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo
Coorientadores

LAVRAS - MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Orlando, Débora Ribeiro .

Eventos patológicos em placenta e soro de cabras
naturalmente infectadas por *Neospora caninum* / Débora Ribeiro
Orlando. - 2017.

105 p. : il.

Orientadora: Mary Suzan Varaschin.

Coorientadores: Ana Paula Peconick, Djeison Lutier

Raymundo

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Caprino. 2. Aborto. 3. Resposta imune e neosporose. I.
Varaschin, Mary Suzan. II. Peconick, Ana Paula. III. Raymundo,
Djeison Lutier. IV. Título

DÉBORA RIBEIRO ORLANDO

**EVENTOS PATOLÓGICOS EM PLACENTA E SORO DE CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS POR *Neospora caninum***

***PATHOLOGIC EVENTS IN PLACENTA AND SERUM OF NATURALLY
INFECTED GOATS WITH *Neospora caninum****

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 a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de janeiro de 2017.

Profa. Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Prof. Dr. Fladimir Wouters	UFLA
Prof. Dr. Christian Hirsh	UFLA
Profa. Dra. Cláudia Braga Pereira Bento	ICA (UFVJM)

Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo
Coorientador

LAVRAS - MG

2017

AGRADECIMENTO

Obrigada, Deus, por me guiar nesta jornada. Foi Ele quem me forneceu as ferramentas, a força e o ânimo para vencer todas as batalhas e alcançar a vitória. Em momentos de dificuldade, foi Ele quem sempre me mostrou a luz e o caminho certo.

Agradeço aos meus pais (Anelícia e Ivanir): vocês sempre serviram de inspiração para que eu enfrentasse as intempéries. Aos meus irmãos (Vanessa, Patrícia e Júnior): vocês sempre me mostraram o lado bom da vida. Ensinarão-me que, por mais que existam momentos difíceis, são os momentos mais felizes que nos marcam. Amo todos vocês!!

Agradeço ao meu amado marido Eric Francelino Andrade. Você sempre foi e será meu ombro amigo, meu companheiro, meu cúmplice. A pessoa a quem sempre recorro, em meus momentos de fraqueza, mas que com seu sorriso, sempre soube juntar meus pedaços e me restaurar. Te amo muito! À nossa pequena Lavínia, que, mesmo não sabendo a cor do mundo, esteve junto comigo nesta etapa final.

Obrigada aos grandes amigos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), que sempre me apoiaram nesta luta, deram-me a oportunidade de trabalhar, em um ambiente agradável, exercendo meu dom de professora.

Agradeço muito aos amigos da Patologia (UFLA). Ao Rafael Carneiro, Ivam, Lizia, Daniel, Marcus, Alinne, Luan e Matheus: vocês foram meus braços quando não pude estar presente. Não tenho palavras para agradecer-lhes, meus meninos. À Angélica e ao Flademir, vocês são minha inspiração na vida pessoal e profissional. Tenho orgulho de ter conhecido vocês, pessoas sábias, humildes e exemplares. À minha amiga e orientadora Mary Suzan Varaschin, exemplo de mulher. Ensinou-me a enfrentar os problemas sem perder o sorriso. Você não foi

apenas uma orientadora, mas um exemplo a seguir, obrigada por tudo. Ana Paula Peconick, obrigada por dedicar um pouco de seu tempo a me ajudar nos momentos de preocupação (você sabe que não foram poucos). Nunca perca essa doçura que só você tem. Muito obrigada! Agradeço a todos que me estenderam a mão e me ajudaram, mesmo que tenha sido para me passar uma mensagem de carinho e força. Agradeço ao programa de Ciências Veterinárias pela oportunidade e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro.

Com muito respeito, agradeço aos animais utilizados nos experimentos que, com sua vida, permitiram a obtenção destes resultados.

Enfim, todos vocês são personagens importantes da minha história. Espero que esta não seja apenas uma página virada, mas, sim, o início de um novo capítulo das nossas vidas!!!

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo”

Francisco Cândido Xavier.

RESUMO GERAL

Durante uma gestação, as fêmeas desenvolvem uma resposta imunológica do tipo Th2. No entanto, quando ocorre infecção ou recrudescência de agentes infecciosos, há polarização para o tipo Th1 que pode ser efetiva em limitar a multiplicação do parasito, porém está associada ao aborto. A recrudescência da infecção crônica pode acontecer durante a gestação dos ruminantes e não se conhece as suas causas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar parâmetros da resposta imune durante a infecção crônica natural por *Neospora caninum* em cabras prenhes. Assim, foram quantificadas citocinas no soro (IL-4, IL-10, IL-12, IFN γ e TNF- α) pela técnica de ELISA em nove animais (sete positivos para *N. caninum*). Foi realizada imunomarcagem de linfócitos T, linfócitos T auxiliares, linfócitos B, T γ delta, *Natural Killer*, macrófagos, INF- γ e MHC-II na interface placentária materno-fetal. Os dados referentes à contagem de células das cabras com diferentes titulações para *Neospora caninum* foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Cabras reagentes e não reagentes para *N. caninum* têm variações da produção de citocinas durante os cinco meses da gestação. Somente uma cabra apresentou cotilédones com bordas aumentadas, irregulares e edemaciados, membrana corioalantoidea com edema próximo aos cotilédones e hemorragias multifocais. Microscopicamente as lesões mais frequentes foram infiltrado linfoplasmocitário multifocal discreto no mesênquima trofoblástico, áreas de necrose no epitélio coriônico, mineralização multifocal e infiltrado linfo-histioplasmocitário difuso moderado na submucosa uterina. Em uma cabra foram visualizados vários cistos de *N. caninum*. Houve diferenças estatísticas entre o número de células marcadas pela imunohistoquímica em animais positivos comparado aos animais negativos. Assim, ocorre uma resposta imunológica diferenciada para animais positivos e negativos mas nem sempre ocorre o aborto.

Palavras-chave: Caprino. Aborto. Resposta imune e neosporose. Gestação.

GENERAL ABSTRACT

During gestation, females develop a type Th2 immunological response. However, when infection or resurgence of infectious agents occur, a polarization for type Th1 immune response can limit the multiplication of the parasite, yet it is related to abortion. A resurgence of the chronic infection can occur during the gestation of ruminants, and its causes are still unknown. The objective of this work was to evaluate parameters of immune response during natural chronic infection by *Neospora caninum* in pregnant goats. Thus, serum cytokines (IL-4, IL-10, IL-12, IFN γ and TNF- α) were quantified by ELISA technique, on nine animals (seven of them positive to *N. caninum*). Immunostaining for T lymphocytes, auxiliary T lymphocytes, B lymphocytes, Tgamma delta, Natural Killer, macrophages, IFN γ and MHC-II were done on the maternal-fetus placental interface. The data regarding the cell count of the goats with different titers for *Neospora caninum* were submitted to the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Reacting and non-reacting goats present variations in the production of cytokines during the five months of gestation. Only one goat presented cotyledons with irregular and swollen edges, chorioallantoic membrane with edema near the cotyledons and multifocal petechiae. Microscopically, the most frequent lesions were discrete multifocal lymphoplasmacytic infiltrate in the trophoblastic mesenchyme, necrosis areas in the chorionic epithelium, multifocal mineralization and discrete multifocal lymphohistioplasmacitary infiltrate in the uterine submucosa. Only in one goat, many *N. caninum* cysts were seen. There was statistical difference between the number of cells marked by the immunohistochemistry in positive animals when compared to negative animals. Thus, a differentiated immunological response occurs for positive and negative animals, yet, not always, does the abortion occur.

Keywords: Goat. Abortion. Immune response and neosporosis. Gestation.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Neospora caninum e lesões placentárias	15
2.2	Imunologia da gestação em animais parasitados por Neospora caninum	17
2.2.1	O complexo principal de histocompatibilidade (MHC)	20
2.2.2	Linfócitos	21
2.2.3	Macrófagos	26
2.2.4	Citocinas e a gestação	27
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	40
	ARTIGO 1 - CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA INFECÇÃO POR Toxoplasma gondii EM CAPRINOS	40
	ARTIGO 2 - Perfil de citocinas em cabras gestantes naturalmente infectadas por Neospora caninum	58
	ARTIGO 3 - Eventos imunopatológicos em placenta de cabras naturalmente infectadas por Neospora caninum	81
	CONCLUSÕES GERAIS	103
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética	104
	ANEXO B - Cabras Utilizadas no experimento	105

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário intracelular conhecido como um dos principais agente causadores de abortos em bovinos leiteiros e de corte em todo o mundo. O parasito tem como hospedeiros definitivos canídeos domésticos e selvagens e já foi isolado de várias espécies animais (DUBEY; SCHARES, 2011).

Apesar do cão e outros carnívoros espalharem oocistos no ambiente e estes serem infectantes, por via oral, para outras espécies, a transmissão vertical de *N. caninum* é considerada a principal forma de infecção (ALMERIA et al., 2003), em rebanhos bovinos leiteiros (MALCALDOWIE et al., 2004) e caprinos (MESQUITA et al., 2013). Porém a grande maioria dos animais nasce clinicamente sadia e os eventos que transformam uma infecção aparentemente inofensiva em uma doença fatal, ainda, não foram elucidados (MACALDOWIE et al., 2004).

A neosporose clínica em ruminantes se manifesta por falhas reprodutivas, entre elas a ocorrência de abortos recorrentes, geralmente, no período de cinco a seis meses de gestação em bovinos. Além dos abortos, pode haver absorção embrionária, fetos mumificados, macerados, nascimento de animais vivos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas permanentemente infectados (DUBEY; SCHARES, 2011). Já, em caprinos, além dos relatos de abortos ou falhas reprodutivas (MESQUITA et al., 2013; VARASCHIN et al., 2012), é descrito o nascimento de animais não infectados por *N. caninum* a partir de mães infectadas ou soropositivas (MESQUITA et al., 2013).

O aborto ocorre após transmissão transplacentária a qual pode ser exógena ou endógena. A primeira é decorrente da ingestão de oocistos liberados,

nas fezes de cães, já a segunda é em razão da recrudescência de bradizoítos, que se transformam em taquizoítos, considerados a forma infectante (DUBEY; SCHARES, 2011; ROSBOTTON et al., 2008). Após a transmissão, não se conhecem, ao certo, os mecanismos específicos causadores do aborto. Possivelmente, fatores como tempo da primeira infecção, tempo de recrudescência da infecção em animais persistentemente infectados, resposta imunológica materna, a cepa parasitária, suscetibilidade do hospedeiro e o estágio de desenvolvimento fetal em que a infecção foi adquirida, influenciam a ocorrência ou não do aborto.

Alguns trabalhos relacionam a participação de citocinas na polarização da resposta imune mediada por linfócitos T auxiliares como fator desencadeador de eventos humorais e celulares específicos que causariam lesões, as quais, por sua vez, levam ao aborto (MALEY et al., 2006; ROSBOTTON et al., 2008; ROSBOTTON et al., 2011). A resposta tipo Th1, com a produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), é conhecida por ser efetiva em limitar a multiplicação do parasito (INNES et al., 1995). Esta resposta é diminuída, na gestação normal, favorecendo a sobrevivência e a multiplicação do parasito (INNES et al., 2001). Já, para Entrican (2002), pequenas quantidades do parasito, enquanto lesionam discretamente a placenta, podem causar mudança de uma resposta Th2 para uma Th1, ocasionando o aborto. Toda essa alteração está relacionada com a liberação de citocinas e participação de células *Natural killer* (NK) (ENTRICAN, 2002).

Em um estudo realizado por Bartley et al. (2004), foi sugerido que, durante estágios iniciais da infecção (14 dias), *N. caninum* consegue atravessar a placenta e causar morte fetal. Entretanto, em estágios mais avançados da infecção, é provado que tanto a mãe quanto o feto conseguem desenvolver resposta imunológica protetora, que é compatível com o prosseguimento da gestação, porém, ainda assim, o feto pode ser infectado (BARTLEY et al., 2004;

MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2011). Maley et al. (2006) demonstraram, após 28 dias de inoculação experimental de *N. caninum*, infiltrado inflamatório composto por células mononucleares e polimorfonucleares, tanto do segmento fetal quanto do materno da placenta, sugerindo o início da imunidade materna mediada por células.

Em um estudo anterior, realizado em caprinos do próprio setor de Patologia Veterinária (UFLA), (MESQUITA, 2012) foi demonstrada necrose e infiltrado inflamatório, na placenta de cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*. Células inflamatórias ocorreram em placentas tanto de cabras que abortaram como naquelas que pariram normalmente, sendo mais acentuadas no primeiro grupo, porém não foi realizada a caracterização fenotípica destas células. A caracterização do tipo celular associada com a avaliação da expressão de citocinas, no soro desses animais prenhes, assim como a sua associação com a ocorrência de abortos poderia auxiliar no entendimento dos abortos por *N. caninum*, explicando por que, algumas vezes, ocorre aborto e outras não.

Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de se explicar a ocorrência ou não desses abortos. Orozco, Morales e Salmerón (2013) procuraram estudar as lesões e as células inflamatórias em tecido uterino de bovinos infectados por *N. caninum*. Observou-se que o agente pode se encistar em algumas camadas da parede uterina (endométrio e miométrio) no intuito de esperar por um momento propício para infectar o feto. Além disso, os autores observaram que a maioria das células inflamatórias nesse tecido é constituída, principalmente, de macrófagos e linfócitos. No entanto, são células que, naturalmente, estão presentes em úteros saudáveis de animais prenhes e não prenhes. Além do mais, macrófagos, também, possuem papel na reparação tecidual, com importante função no debridamento de células da placenta. Já Bartley et al. (2013) descreveram a resposta sorológica em vacas e fetos. Neste estudo chegou-se à conclusão de que ambos (feto e vaca) conseguem

desenvolver resposta imunológica inata e adaptativa humoral e mediada por células contra *N. caninum*. Além disso, também, foi possível observar que o feto e a mãe desenvolvem respostas diferentes, dependendo da fase de gestação.

Na patogenia da neosporose, é importante entender como ocorre a resposta imunológica na placenta, como é desencadeada a resposta na interface materno-fetal. Em busca desse entendimento, Cantón et al. (2014) descreveram o aumento de células inflamatórias marcadas pelo CD3, CD4, CD8, CD79 e *NK*, em placentas de búfalos (*Bubalus bubalis*); e Cantón et al. (2013), em placentas bovinas positivas para *N. caninum*, principalmente, naqueles casos em que ocorreu morte fetal. Cantón et al. (2013) destacaram que a maior diferença entre células inflamatórias de animais negativos e positivos ocorre aos 42 dias de gestação. Logo, fica claro que há relação entre resposta imune e a ocorrência do aborto.

Este trabalho tem por objetivo contribuir para o conhecimento da resposta imunológica relacionada com a patogenia de *N. caninum* na interface materno-fetal em placenta de caprinos e estudar a expressão de citocinas no soro de cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, a fim de caracterizar o tipo de resposta imune (Th1/Th2) como fator desencadeador de eventos celulares específicos, que induzem lesões que levam ao aborto, uma vez que não há trabalhos que descrevem a dinâmica desses eventos em caprinos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Neospora caninum* e lesões placentárias

Neospora caninum é um protozoário Apicomplexa que pertence à família Sarcocystidae (DUBEY et al., 1988). Esse protozoário é, estruturalmente, semelhante ao *Toxoplasma gondii*, mas distinto, inclusive, do ponto de vista antigênico (MINEO et al., 2001). Possui o cão (*Canis familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY; SCHARES, 2011) como hospedeiros definitivos (HD). Várias espécies animais são descritas como hospedeiros intermediários (HI), entre elas os caprinos (MCALLISTER et al., 1998). No seu ciclo biológico, os HD eliminam oocistos não esporulados nas fezes após a ingestão de tecidos ou órgãos de HI, provavelmente, ingerindo membranas placentárias contaminadas com cistos teciduais. Os oocistos podem esporular no ambiente em 24 h (DIJKSTRA et al., 2008; LINDSAY et al., 1995).

A neosporose é uma importante causa de falhas reprodutivas em ruminantes em várias partes de mundo (DUBEY, 2003). Em caprinos, há poucos relatos de abortos, natimortos ou nascimento de cabritos fracos associados com *N. caninum*, (BARR et al., 1992; CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; DUBEY, 2003; ELENI et al., 2004; LINDSAY et al., 1995; MESQUITA et al., 2013; VARASCHIN et al., 2012). Nos ruminantes, a infecção intrauterina é a principal forma de transmissão de *N. caninum*. Em rebanhos bovinos infectados, 81 a 95% de vacas soropositivas podem transmitir a infecção para suas crias (WOUDA; DUBEY; JENKINS, 1997). Também é descrito aumento nos títulos de anticorpos, quatro a cinco meses antes do parto em bovinos (DUBEY, 2003) e, a partir do terceiro mês de gestação em caprinos (MESQUITA et al., 2013), sugerindo que ocorra reativação de uma infecção

latente (DUBEY, 2003). Porém, pouco se conhece sobre esse mecanismo de reativação, embora se acredite que ocorra parasitemia durante a gestação, com infecção fetal (DUBEY, 2003).

As lesões macroscópicas associadas à neosporose são raras, sendo descritos em cabras somente hidrocefalia com hipoplasia de cerebelo (DUBEY; LINDSAY, 1996) e um quadro de porencefalia, caracterizado por ausência de substância branca cerebral com consequente dilatação dos ventrículos laterais pela perda de tecido (hidrocefalia ex-vácuo) (VARASCHIN et al., 2012). As lesões microscópicas são muito utilizadas no diagnóstico do aborto por *N. caninum* e os órgãos de eleição, para o diagnóstico histopatológico, são encéfalo, coração, fígado (DUBEY, 2003), músculo esquelético e pulmão, estes dois últimos, principalmente, nos casos de autólise do encéfalo (PESCADOR et al., 2007).

Em vacas prenhes infectadas por *N. caninum*, as lesões na placenta ocorrem nos cotilédones e consistem de áreas de necrose dos vilos placentários fetais, necrose e inflamação mononuclear em áreas adjacentes ao septo materno e inflamação na base da carúncula (MALEY et al., 2006). Os taquizoítos podem estar associados às áreas necróticas dos vilos placentários fetais e bradizoítos em trofoblastos (BARR et al., 1990; MALEY et al., 2006).

Em placentas oriundas de abortos e natimortos de cabras causados por *N. caninum* foram observadas lesões acentuadas, caracterizadas, principalmente, por necrose, envolvendo o mesênquima dos vilos coriônicos e células trofoblásticas, além de inflamação mononuclear, por vezes associada a infiltrado neutrofílico. O DNA de *N. caninum* foi detectado nessas placentas, no entanto, não foram visualizadas estruturas parasitárias na IHQ, mas somente nos fetos abortados. Já, em dez placentas de cabras, naturalmente infectadas e que pariram conceptos saudáveis, nenhuma apresentou lesões significativas, mas DNA de *N.*

caninum foi detectado em seis delas. Destas seis, em apenas uma se detectou *N. caninum* por meio de IHQ (MESQUITA et al., 2013).

Nos placentomas, são descritos como lesões o edema entre as estruturas maternas e fetais, focos de inflamação não supurativa no septo placentário e necrose em mesênquima e trofoblastos nas vilosidades coriônicas, com necrose no placentoma tanto no componente fetal como no materno. Infiltrado inflamatório misto, com neutrófilos, eosinófilos (estes no septo materno), linfócitos, histiócitos e macrófagos foram observados. O recrutamento de eosinófilos, nas lesões placentárias acentuadas, ocorreu 28 dias, após inoculação experimental de *N. caninum* e foi associado à produção de IL-5 (Th2), que induz a produção e a ativação de eosinófilos, os quais desempenham importante papel imune em infecções parasitárias (MACALDOWIE et al., 2004).

Uma resposta imune celular do tipo Th1 é tida como importante fator para proteção contra infecção por protozoários. A resposta imune Th2 é considerada necessária para a manutenção da gestação, principalmente, na fase inicial. Já a resposta materna Th1, em que o IFN- γ , mediador dessa resposta, pode causar lesões na placenta, leva ao aborto. Quando a infecção ocorre em estágios mais avançados da gestação, a capacidade de resposta imunológica do feto e, também, da mãe podem determinar o sucesso da gestação (BARTLEY et al., 2004; MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2011).

2.2 Imunologia da gestação em animais parasitados por *Neospora caninum*

A gestação é um evento único e complexo nos mamíferos e envolve uma série de mecanismos regulatórios por parte do sistema imune da mãe e do feto, já que o feto pode ser considerado um aloenxerto, por possuir determinantes antigênicos tanto da mãe quanto do pai. Vários mecanismos relacionados ao sucesso da não rejeição do aloenxerto são hoje conhecidos. Porém, estes fatores podem entrar em situação de risco, quando há agentes infecciosos na placenta,

como *N. caninum*, que podem causar danos ao sistema de tolerância da gestação (ENTRICAN, 2002).

Em bovinos, a fixação do feto à carúncula materna, para formar a placenta, começa a partir do 19º dia de gestação (WATHES; WOODING, 1980). Em ovelhas, esse reconhecimento materno ocorre entre os dias 12 e 13 da gestação (MOOR; ROWSON, 1966). Já, em cabras, este reconhecimento ocorre entre os dias 16 e 17 (GNATEK et al., 1989). O que mantém a gestação até este ponto é um sinal de reconhecimento de prenhez para evitar a luteólise (WATHES; LAMMING, 1995). Em vacas prenhes, esse sinal consiste na produção de IFN-f pelo trofoblastos do 10º até o 25º dia da gestação (ROBERTS et al., 1992) bem como da inibição da formação de receptores de ocitocina e, portanto, da luteólise (WATHES; LAMMING, 1995). O IFN-f é reconhecido por sua capacidade de interagir com o sistema imune materno para estabelecer e manter a gestação em bovinos e ovinos. Picos de sua expressão, pouco antes do tempo de reconhecimento materno da gestação e suas interações com o útero, são cruciais para a gestação. O que controla sua expressão, ainda, não é conhecido (EALY; YANG, 2009).

A manutenção da função lútea, durante a fase inicial da gestação, é, aparentemente, mediada pela interação de proteínas do concepto com o endométrio uterino, resultando na alteração no metabolismo da PGF2 α (prostaglandina). Em ovinos, vacas (THATCHER et al., 1986) e cabras (HOMEIDA; COOK, 1982), a luteólise, durante o ciclo estral, é associada com padrões pulsáteis de produção de PGF2 α uterino. Durante a fase inicial da gestação, pulsos de PGF2 α diminuem em frequência e/ou amplitude e o corpo lúteo é mantido (GNATEK et al., 1989).

Estudos demonstram que, em ruminantes, a gestação possui um importante efeito sobre a população de linfócitos e macrófagos uterinos (SKOPETS et al., 1992). Ambos são reduzidos, significativamente, entre o início

e a metade da gestação em bovinos (VANDER WIELEN; KING, 1984) e ovinos (LEE et al., 1992). Na metade da gestação, praticamente, nenhum linfócito ou macrófago é encontrado em carúnculas endometriais, mas, sim, no endométrio entre as carúnculas (LOW; HANSEN; DROST, 1990). As carúnculas são os locais em que o córion fetal entra em contato com o endométrio materno formando os placentomas, assim, isso indica que a tolerância materna ocorre em local específico de áreas adjacentes de tecidos fetais (LEUNG et al., 2000).

Eventos que ocorrem durante a gestação e a influência da exposição pré-natal ao protozoário, no desenvolvimento de uma resposta imune, são questões críticas, que devem ser abordadas, para se compreender o mecanismo associado ao controle de *N. caninum* na gestação (WILLIAMS; TREES, 2006). A proliferação de linfócitos e diminuição na produção de IFN- γ ocorrem, na metade da gestação (INNES et al., 2001), sendo o IFN- γ fundamental para a resposta celular (INNES et al., 1995).

Estudos imunológicos são cruciais, para entender a patogênese da neosporose e a evolução da infecção parasitária, mas as investigações, em que se aborda a imunidade do hospedeiro, são um desafio (DONAHOE et al., 2015). A resposta imune do hospedeiro a *N. caninum* é, geralmente, estudada em modelo bovino ou murino. Logo, não se pode extrapolar este conhecimento para as demais espécies. Além disso, muitos estudos utilizam a infecção de animais por via parenteral em vez da via entérica natural da infecção, relacionada à dificuldade extrema de se obter oocistos de *N. caninum* (DUBEY, SHARES, 2011).

Ainda não existem estudos que detalhem a resposta imune da mãe contra a infecção por *N. caninum* (BARTLEY et al., 2012; BARTLEY et al., 2013; INNES, 2007; KLEVAR et al., 2007). Muitos são os fatores que influenciam o resultado da infecção por *N. caninum* em animais prenhes. Dentro destes fatores são incluídos: quantidade e duração da parasitemia (INNES et al., 2000), estirpe

do parasita (algumas cepas são mais patogênicas que outras) (ROJO-MONTEJO et al., 2009), estado imunológico da mãe e idade gestacional do feto no momento da infecção (INNES et al., 2000; ROJO-MONTEJO et al., 2009), espécie animal infectada (ARRANZ-SOLÍS et al., 2016), rota de infecção (MACALDOWIE et al., 2004) e se a infecção é natural ou experimental. A transmissão vertical, de forma natural, é muito mais eficiente do que a transmissão experimental, chegando a taxas de 81% de transmissão, em bovinos (PIRAINE et al., 2015) e de 77%, em caprinos (MESQUITA et al., 2013).

Estudos recentes fornecem evidências da ocorrência de uma resposta imune diferente em bovinos de diferentes raças (SANTOLARIA et al., 2011). Além disso, *N. caninum* possui uma grande variedade de antígenos, sendo alguns responsáveis pela modulação de uma resposta imune protetora para o hospedeiro, enquanto outros possuem o efeito oposto, favorecendo a invasão pelo parasito e causando danos ao hospedeiro (HEMPHILL et al., 2013). Isto foi observado, por exemplo, em um experimento utilizando a vacina experimental contra a proteína NcMIC4. Ela foi incapaz de levar a proteção, mas tornou os animais mais sensíveis à infecção pelo protozoário (SRINIVASAN et al., 2007).

2.2.1 O complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

O complexo principal de histocompatibilidade ou MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*) é designado por um grupo de moléculas que são expressas na superfície de quase todas as células nucleadas do corpo. São componentes essenciais do sistema imune dos mamíferos e coevoluíram com os receptores de células T, sendo importantes para a sua ativação e no fenômeno de seleção positiva e negativa de linfócitos no timo. Por outro lado, as moléculas de MHC podem agir como antígenos capazes de desencadear respostas imunes potentes, que resultam em rejeição de transplantes entre indivíduos incompatíveis (ENTRICAN, 2002).

A expressão de proteínas de MHC de classe I não ocorre nos placentomas bovinos e no epitélio coriônico de ovinos, entretanto, células trofoblásticas binucleadas de bovinos expressam moléculas não polimórficas de MHC de classe I. Não se sabe ao certo os motivos da expressão de MHC classe I, nas células binucleadas e se simplesmente a sua não expressão já é suficiente para a rejeição do aloenxerto (ENTRICAN, 2002).

Em vacas saudáveis, o MHC de classe II, além de ser expresso nas células apresentadoras de antígenos, também, é expresso por poucas células fibroblásticas e uma alteração nesse padrão de expressão de moléculas de MHC classe II ocorre, em vacas infectadas por *N. caninum*, principalmente, ao redor de focos de necrose da placenta. Isto pode estar relacionado com a detecção de altos níveis de IFN- γ na placenta. Na gestação, esta citocina está relacionada com a expressão de moléculas de MHC classe II em linhagens de células trofoblásticas. Em bovinos, a expressão de moléculas de MHC classe II pela placenta é correlacionada à ocorrência de abortos por *N. caninum* (ROSBOTTOM et al., 2011). A expressão de MHC-II, também, é relatada em outras doenças de ruminantes. Em ovinos, a expressão de moléculas MHC-II por macrófagos foi relacionada a aborto em modelos de infecção por *Chlamydia abortus* (SAMMIN et al., 2006).

2.2.2 Linfócitos

Células *Natural killer* (NK) são linfócitos do sistema imune inato, grandes e granulares, encontradas no sangue periférico e na decídua materna durante a gestação. A função efetora das células NK pode ser controlada pelo modo que seus receptores de superfície reconhecem moléculas de MHC-I, podendo tanto ativar quanto inibir sua função citolítica. Células NK são capazes de reconhecer células tumorais ou infectadas por microrganismos intracelulares que apresentam alteração na expressão de MHC-I. As células NK induzem

citólise, por meio de perforinas e granzimas, que induzem morte celular por apoptose (CRUVINEL et al., 2010; ENTRICAN, 2002).

Moffet (2002) sugeriu que as células NK endometriais são importantes na regulação da invasão trofoblástica, pois apresentam baixa ação citotóxica contra o trofoblasto (MOFFET, 2002). Maley et al. (2006) demonstraram, pela primeira vez, células NK na placenta de vacas infectadas, experimentalmente, por *N. caninum*, aos 70 dias de gestação, sugerindo que elas têm papel importante nesta fase, podendo culminar em morte fetal.

As células NK desempenham resposta primária à infecção por protozoários; indiretamente, pela produção de IFN- γ , em resposta à IL-12, que ativa macrófagos e, diretamente, em resposta a fibroblastos infectados *in vitro*, com aumento de citotoxicidade mediada por perforina, destruindo fibroblastos infectados por *N. caninum* (BOYSEN et al., 2006).

Desta forma, as células NK são prejudiciais ao trofoblasto infectado, pois induzem a lise trofoblástica, causando a perda fetal. Esse fenômeno só acontece em decorrência de sua conversão em Linfocinas Assassinas Ativadas (LAK) por IFN- γ , TNF- α e IL-12 (DRAKE; HEAD, 1989). No início de uma infecção, patógenos invasores são capturados pelas células apresentadoras de antígeno que liberam citocinas, como IL-12, que irão ativar células NK (KLEVAR et al., 2007). As NK não são só alvo das citocinas, mas também produtoras de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ . Essas células são induzidas a produzir IFN γ *in vitro*, mesmo na ausência de IL-12, mas o real papel da NK *in vivo* não é investigado (KLEVAR et al., 2007). Geralmente são elas que iniciam uma resposta imune inata, produzindo citocinas e fazendo a lise do órgão alvo (SCHARTON-KERSTEN; SHER, 1997).

Em relação à resposta adaptativa com produção de anticorpos, verifica-se que ela tem um papel na redução da invasão do parasito em células hospedeiras (INNES et al., 2002). No estudo de Bartley et al. (2013), em que foi

realizada inoculação de *N. caninum*, em fêmeas prenhes aos 210 dias de gestação, os níveis médios de IgG atingiram o pico em 21 dias pós-inoculação e permaneceram elevados ao longo do resto do período experimental. Já, nos animais controles negativos, nesta mesma época, os níveis de IgG permaneceram abaixo de 0,50pg/ML. Os níveis de anticorpos são variáveis durante o período gestacional (PARE; THURMOND; HIETALA, 1997).

As células $T\gamma\delta$ são linfócitos, geralmente periféricos, que apresentam receptores de células T, com diversidade limitada, compostos por cadeias $\gamma\delta$. Podem atuar como sentinelas na primeira linha de defesa do organismo em mucosas e pele. Essas células podem reconhecer antígenos, mesmo na ausência de sua apresentação por moléculas clássicas de MHC. Dentre suas funções efetoras, estão relacionadas ao reconhecimento e à apresentação de antígenos, com ativação do sistema imune, liberação de citocinas, tanto para resposta Th1 quanto Th2, apresentação de subpopulações com citotoxicidade, outras com funções auxiliares, ativando células dendríticas e linfócitos B. Seu papel pode estar relacionado, principalmente, a funções antimicrobianas (AAGAARD-TILLERY; SILVER; DALTON, 2006).

A localização dessas células pode variar muito entre espécies e idade do indivíduo. Em ruminantes, são encontradas, principalmente, na pele e no sangue periférico (ENTRICAN, 2002). A presença dessas células, na decídua humana, na gravidez, sugere que tenham função relacionada com a atividade das células NK, no controle da invasão trofoblástica, contribuindo para a tolerância ao aloenxerto (ENTRICAN, 2002). A baixa quantidade de células $T\gamma\delta$, na decídua humana, geralmente, está relacionada a abortos recorrentes (AAGAARD-TILLERY; SILVER; DALTON, 2006). Essas células foram descritas, em ruminantes, em áreas interplacentomais do endométrio, sugerindo que podem estar relacionadas ao controle da invasão trofoblástica (CANTÓN et al., 2013; ENTRICAN, 2002).

Células T $\gamma\delta$ foram identificadas por IHQ, em um estudo conduzido por Maley et al. (2006), no qual vacas foram, experimentalmente infectadas por *N. caninum*, aos 70 dias de gestação. Lesões iniciais de necrose de placentomas estavam relacionadas com poucas quantidades de células T $\gamma\delta$ e sua quantidade aumentou à medida que as lesões aumentavam, contribuindo, assim, para a hipótese de que essas células participam na formação de uma primeira linha de defesa contra patógenos na interface materno-fetal.

Por outro lado, quando antígenos exógenos são capturados e processados (por exemplo, por células dendríticas), eles são apresentados aos linfócitos T auxiliares (marcador CD4). Caso ocorra uma interação entre o receptor e o antígeno, os linfócitos T CD4 são estimulados a começar uma resposta imune, por meio de citocinas, divisão e diferenciação celular. Os receptores, presentes na superfície das células T, são específicos, mas de grande diversidade (TIZARD, 2014).

Os linfócitos T CD4 são divididos em subclasses, de acordo com seu padrão de produção de citocinas, após estímulo por uma célula apresentadora de antígenos (APC) e o microambiente de citocinas no momento de reconhecimento do antígeno. De acordo com o ambiente de citocinas, um linfócito precursor *naive* (Th0) pode se diferenciar, por exemplo, em Th1, Th2, Th17 e outros perfis apresentando, cada um, diferentes respostas efetoras (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Os linfócitos Th1 podem levar à produção de citocinas, IL-2 e IFN- γ , com funções efetoras específicas, como aumento da citotoxicidade de linfócitos CD8, ativação de macrófagos pela via clássica contra células infectadas com patógenos intracelulares. Há uma retroalimentação da produção de IFN γ , que estimula mais LTh0 a se diferenciarem em LTh1 e inibindo a diferenciação LTh2. A polarização Th1 é essencial na resposta contra patógenos intracelulares (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Os linfócitos Th2 desempenham papel importante, predominantemente, na resposta humoral, produzindo as citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que favorecem a formação de anticorpos. A produção de IL-4 aumenta a produção de Ig E por plasmócitos. Esta imunoglobulina é importante nas respostas alérgicas, enquanto que a produção de IL-5 induz a produção e a ativação de eosinófilos, que desempenham papel importante na resposta contra infecções por helmintos. A polarização da resposta Th2 por IL-4, também, inibe a polarização Th1 (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Infecções experimentais por *N. caninum* demonstraram que a polarização da resposta Th1 é importante para a proteção contra o protozoário e sempre está relacionada com células que expressam IFN- γ na interface materno-fetal. Desta forma, linfócitos T CD4 possuem papel muito importante, no controle da neosporose, pois induzem lise de células infectadas pelo protozoário, aumentando a produção de IFN- γ (CANTÓN et al., 2014).

Grandes quantidades de células T CD4 foram identificadas por IHQ, no septo das carúnculas maternas de vacas infectadas experimentalmente, aos 70 dias de gestação, juntamente com a expressão de IFN- γ , detectada na hibridização *in situ* (MALEY et al., 2006). Orozco, Morales e Salmerón (2013) e Rosbottom et al. (2007), também, demonstraram que havia células T CD4+ em grandes quantidades nos septos carunculares de vacas prenhas infectadas por *N. caninum*.

Linfócitos T CD8 estão ligados ao reconhecimento de antígenos intracitoplasmáticos apresentados pelas células, por meio de moléculas de MHC classe I, ou seja, estão mais relacionados a uma resposta do tipo Th1. Esses têm papel importante, na resolução de infecções, causadas por microrganismos intracelulares e, em células tumorais, induzindo morte das células infectadas por apoptose. Essas células ocorrem, principalmente, no septo das carúnculas uterinas de vacas prenhas infectadas por *N. caninum*, sempre associadas com

infiltrado de células T CD4, porém em menor quantidade (MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2007).

Alguns trabalhos, sobre neosporose, mostram linfócitos B (LB), em meio a inflamações causadas por células T (CD4, CD8) e NK, sempre em pequenas quantidades, mas não se observa qual é a sua função, na reação inflamatória contra *N. caninum*, na interface materno-fetal (MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2007). Rosbottom et al. (2007) demonstraram que LB, também, ocorrem em pequenas quantidades no endométrio de vacas não prenhes e vacas prenhes não infectadas.

2.2.3 Macrófagos

Os macrófagos desempenham importante papel, na imunidade inata e adaptativa, sendo capazes de fagocitar patógenos e debris celulares, processar antígenos e apresentá-los a linfócitos T, via moléculas de MHC de classe I e II, quando ativados pela via clássica. Apresentam função microbicida e tumoricida, participam do reparo tecidual e regulam a resposta inflamatória. Estão presentes em tecidos e podem permanecer por anos em seus sítios. No sangue, ocorrem como monócitos, representando 3% a 8% dos leucócitos circulantes (CRUVINEL et al., 2010).

Em placentas de animais gestantes, naturalmente infectados por *N. caninum*, macrófagos foram relacionados a infiltrados de linfócitos T, em reação a áreas necróticas, mas sempre em pouca quantidade (ROSBOTTOM et al., 2011). Maior quantidade de macrófagos foi observada, em animais experimentalmente infectados, aos 70 dias de gestação, ao redor dos vasos na base das carúnculas. Em infecção experimental, aos 210 dias de gestação, o número de macrófagos foi menor e em quantidade similar a animais não infectados no mesmo período de gestação (ROSBOTTOM et al., 2007). Cantón et al. (2014), também, observaram que, no início da gestação, há aumento na

quantidade de macrófagos em vacas positivas para *N. caninum*. Entretanto outro trabalho relata ausência de macrófagos, na resposta inflamatória na placenta, tanto de animais infectados quanto não infectados por *N. caninum* (OROZCO; MORALES; SALMERÓN, 2013).

2.2.4 Citocinas e a gestação

As citocinas são moléculas proteicas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante uma resposta imune (ENTRICAN, 2002). Na gestação, a grande questão relacionada às citocinas é o balanço entre as respostas Th1 e Th2. A resposta Th1 pode ser, muitas vezes, importante, na resolução de infecções uterinas, mas, por outro lado, altos níveis de citocinas Th1, como IFN- γ , estão relacionados com aborto (ENTRICAN, 2002; AAGAARD-TILLERY; SILVER; DALTON, 2006).

Em modelos de estudo da gestação de vacas infectadas por *N. caninum*, a ocorrência de aborto é dependente da idade gestacional em que ocorreu a infecção fetal. A presença de *N. caninum* na placenta é capaz de induzir forte resposta Th1 materna, no terço inicial da gestação, o que acaba levando ao aborto (MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2007). Entretanto, quando a infecção ocorreu mais tardiamente, a taxa de aborto foi menor e não se percebeu polarização acentuada entre as respostas Th1 ou Th2, pois o perfil Th1 ou Th2 já não é tão importante, para manutenção da gestação em um momento mais tardio, já que houve uma polarização em início da gestação (ROSBOTTOM et al., 2007). Bartley et al. (2004) demonstraram que animais prenhes infectados no terço médio da gestação não sofreram aborto e tanto a mãe quanto o feto desenvolveram resposta Th1, que foi considerada o motivo da resolução da infecção, sem danos à mãe e ao feto.

IFN- γ é responsável por aumentar a expressão de MHC de classe II, favorecendo a apresentação de antígenos, aumentando a chance da célula

infectada ser atacada (PIRAINE et al., 2015). A IL-12 induz a produção de maior quantidade de IFN- γ , linfócitos T e NK (BASZLER et al., 1999). Já TNF- α ativa macrófagos e células NK (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Além das lesões ocorridas na placenta, a resposta do tipo Th1, também, é capaz de prejudicar a distribuição vascular de nutrientes, favorecendo, ainda mais, a ocorrência do aborto (CANTÓN et al., 2014). Então, fisiologicamente, as células trofoblásticas produzem IL-10, criando um ambiente de citocinas, na interface materno-fetal, que polariza as células T auxiliares para o tipo Th2 (WEGMANN et al., 1993). Esta citocina consegue regular, negativamente, a produção de IFN- γ (ENTRICAN, 2002), o que pode facilitar a multiplicação de *N. caninum*, já que age, negativamente, sobre a resposta Th1. A IL-10, juntamente com a IL-4, consegue neutralizar as citocinas inflamatórias.

Um tipo de resposta imunológica humoral que ocorre na gestação é a indução ou formação de anticorpos assimétricos (LABETTA et al., 1986). Em virtude de sua assimetria, não conseguem ativar funções efetoras, como fixação de complemento. Como podem combinar com o antígeno, competem com anticorpos que possuem a mesma especificidade e, assim, atuam como anticorpos de bloqueio. Um exemplo é o do IgG assimétrico que consegue impedir a morte do feto por bloqueio de ações efetoras, como formação do complexo de ataque à membrana (C5b-9), construídos nas vias clássicas do complemento (EBLEN et al., 2000). A via clássica do sistema complemento é ativada por grupos de moléculas de anticorpos na superfície de um organismo estranho. Logo esta via está associada a respostas adaptativas (TIZARD, 2014)

Um dos principais hormônios da gravidez, a progesterona, também, tem importância na regulação imunológica. Esse hormônio inibe, durante a segunda metade da gestação, a secreção de TNF- α e estimula a produção de IL-10 por linfócitos T, para desenvolvimento da resposta Th2 (ENNINGA et al., 2014). O trofoblasto consegue se defender do ataque imunológico da mãe, por meio de

uma imunomodulação e a progesterona, produzida pelo corpo lúteo, é importante nesta defesa (MUNN et al., 1998).

Durante a gravidez, predomina a imunidade humoral (DRUCKMANN; DRUCKMANN, 2005). Na presença de progesterona, linfócitos CD56 sintetizam uma proteína conhecida como Imunomodulador de Bloqueio Induzido pela Progesterona (PIBF) (SZEKERES-BARTHO et al., 1999). Esta proteína possui vários efeitos antiabortivos em fetos *in vivo*. O PIBF pode atuar sobre as células B, aumentando a produção de anticorpos assimétricos (DRUCKMANN; DRUCKMANN, 2005), altera o perfil de secreção das citocinas por linfócitos ativados (aumenta a produção de citocinas Th2, IL-3, IL-4, IL-10) e diminui produção de citocinas do tipo Th1 (IL-12) (FAUST et al., 1999), mantém a atividade baixa das células NK, por meio da menor produção de IL-12 e, também, por inibição da liberação de perforinas (LASKARIN et al., 1999). Desta forma, a progesterona reduz a resposta do tipo Th1 (DRUCKMANN; DRUCKMANN, 2005). Nesse contexto, Innes et al. (2001) descrevem que os picos de respostas celulares contra o agente ocorreram quando os níveis de progesterona estavam baixos.

Desta forma, estudos surgiram com a intenção de suplementar níveis de progesterona, na gestação de vacas prenhes, infectadas por *N. caninum*. Estatisticamente, porém as vacas com titulação alta para *N. caninum* e que receberam progesterona, nos meados da gestação, tiveram probabilidade de 14,3 vezes maior de abortar do que vacas não tratadas (BECH-SA'BAT et al., 2007). O mecanismo que explica isso não é claro, mas, provavelmente, envolve redução na resposta imunológica, mediada por células, já baixa, nesta época da gestação (INNES et al., 2001). O ambiente, na interface materno-fetal, criada pelas citocinas que polarizam resposta Th2, favoreceria a invasão do parasito na placenta e a infecção do feto.

Logo a idade gestacional do feto é crucial para determinar a gravidade da doença (WILLIAMS et al., 2000). Seguindo esse raciocínio, uma infecção, na metade da gestação, pode levar à morte fetal ou ao nascimento de uma cria, congenitamente infectada, com manifestação de sinais clínicos ao nascimento. Já a transmissão vertical, em uma fase mais tardia da gestação, tem uma menor probabilidade de resultar em aborto, provavelmente, pela relativa maturidade do sistema imunológico fetal (INNES et al., 2001). O resultado mais provável de uma parasitemia, em final de gestação, é o nascimento de um bezerro congenitamente infectado (MACALDOWIE et al., 2004; WILLIAMS et al., 2000).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cabras positivas e negativas para *N. caninum* apresentam variações, nos valores de citocinas, durante os cinco meses da gestação, de acordo com as dosagens de citocinas no soro pela técnica de ELISA. As cabras infectadas por *N. caninum* tiveram valores maiores de IFN γ e IL-12 e menores de IL-4 e IL-10, demonstrando polarização para uma resposta imune Th1.

Os resultados demonstraram que, apesar da polarização, para uma resposta imune Th1 como fator de proteção para o hospedeiro e da presença de células inflamatórias, na placenta das cabras, nenhuma cabra abortou e somente em uma foram encontradas lesões macroscópicas e o parasito. Estes achados sugerem que nem sempre a resposta Th1 leva a danos extensos na placenta e, conseqüentemente, ao aborto, assim como à eliminação do parasito, uma vez que este foi observado, na placenta de uma cabra cronicamente infectada, sugerindo que o agente pode pertencer a uma cepa já adaptada ao hospedeiro.

Este é o primeiro estudo sobre quais citocinas e células estão envolvidas, nos eventos imunopatológicos no soro e na interface materno-fetal de caprinos congenitamente infectados por *N. caninum*, contribuindo, assim, para o entendimento da patogenia da neosporose em caprinos.

REFERÊNCIAS

AAGAARD-TILLERY, K. M.; SILVER, R.; DALTON, J. Immunology of normal pregnancy. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 279–95, Oct. 2006.

ALMERIA, S. et al. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 383–92, July 2003.

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**, Paris, v. 47, n. 2, p. 1–13, Jan. 2016.

BARR, B. C. et al. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, United States, v. 27, n. 5, p. 354–361, Sept. 1990.

_____. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, United States, v. 4, n. 3, p. 365–367, July 1992.

BARTLEY, P. M. et al. Development of maternal and foetal immune responses in cattle following experimental challenge with *Neospora caninum* at day 210 of gestation. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 91, Oct. 2013.

_____. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 130, n. 2-3, p. 81–91, Feb./Apr. 2004.

_____. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. **Veterinary Research**, Paris, v. 43, n. 1, p. 1-12, 2012.

BASZLER, T. V. et al. Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1635–1646, Oct. 1999.

BECH-SABAT, G. et al. Progesterone supplementation during mid-gestation increases the risk of abortion in *Neospora*-infected dairy cows with high antibody titres. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n.1-2, p.164-167, Apr. 2007.

BOYSEN, P. et al. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 74, n. 2, p. 953–60, Feb. 2006.

CANTÓN, G. J. et al. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. **Veterinary Research**, Paris, v. 45, n. 1, p. 11, 2014.

_____. Phenotypic characterisation of the cellular immune infiltrate in placentas of cattle following experimental inoculation with *Neospora caninum* in late gestation. **Veterinary Research**, Paris, v. 44, n. 1, p. 60, 2013.

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**, United States, v. 13, n. 5, p. 416–419, Sept. 2001.

CRUVINEL, W. de M. et al. Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434–447, jul./ago. 2010.

DIJKSTRA, F. A. et al. Long-term enhancement of N availability and plant growth under elevated CO₂ in a semi-arid grassland. **Functional Ecology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 975–982, Dec. 2008.

DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology. Parasite and Wildlife**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 216–238, Apr. 2015.

DRAKE, B. L.; HEAD, J. R. Murine trophoblast cells can be killed by lymphokine-activated killer cells. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 143, n. 1, p. 9–14, July 1989.

DRUCKMANN, R.; DRUCKMANN, M. A. Progesterone and the immunology of pregnancy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 97, n. 5, p. 389–396, Dec. 2005.

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

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

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

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

EALY, A. D.; YANG, Q. E. Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v. 61, n. 2, p. 95–106, Feb. 2009.

EBLEN, A. C. et al. Alterations in humoral immune responses associated with recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, New York, v. 73, n. 2, p. 305–13, Feb. 2000.

ELENI, C. et al. Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, n. 3-4, p. 271-274, Sept. 2004.

ENNINGA, E. A. L. et al. Immunomodulatory effects of sex hormones: requirements for pregnancy and relevance in melanoma. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 89, n. 4, p. 520–535, Apr. 2014.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host–pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 126, n. 2-3, p. 79–94, Feb./Apr. 2002.

FAUST, Z. et al. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v. 42, n. 2, p. 71–75, Aug. 1999.

GNATEK, G. G. et al. Maternal recognition of pregnancy in the goat: effects of conceptus removal on interestrus intervals and characterization of conceptus protein production during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 41, n. 4, p. 655-663, Oct. 1989.

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

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 133–150, Jan. 2013.

HEMPHILL, A. et al. Proteins mediating the *Neospora caninum* - host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 5, p. 23-36, Jan. 2013.

HOMEIDA, A. M.; COOK, R. G. Peripheral plasma concentrations of 13.i4-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 and progesterone around luteolysis and early pregnancy in the goat. **Prostaglandins**, Los Altos, v. 24, n. 3, p. 313-321, 1982.

INNES, E. A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 497–504, Nov. 2002.

_____. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 113, n. 1, p. 95–100, July 1995.

_____. Neosporosis: aspects of epidemiology and host immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 916, n.1, p.93–101, 2000.

_____. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 1523–1534, Nov. 2001.

_____. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, London, v. 134, n. 13, p. 1903-1910, 2007.

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, July 2010.

KLEVAR, S. et al. Natural killer cells act as early responders in na experimental infections with *Neospora caninum* in calves. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 3-4, p. 329-339, Mar. 2007.

LABETA, M. O. et al. Structure of asymmetric non-precipitating antibody: presence of a carbohydrate residue in only one Fab region of the molecule. **Immunology**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 311–317, Feb. 1986.

LAŠKARIN, G. et al. Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v. 42, n. 5, p. 312–320, Nov. 1999.

LEE, C. S. et al. Quantitative and qualitative changes in the intraepithelial lymphocyte population in the uterus of non-pregnant and pregnant sheep. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v. 28, n. 2, p. 90–96, Sept. 1992.

LEUNG, S. T. et al. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression. During early pregnancy in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 119, n. 1, p. 25–33, May 2000.

LINDSAY, D. S. et al. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 9, p. 1176–80, Sept. 1995.

LOW, B. G.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 90, n. 1, p. 235–243, Sept. 1990.

MACALDOWIE, C. et al. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 131, n. 2–3, p. 142–156, Oct. 2004.

MALEY, S. W. et al. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 135, n. 2–3, p. 130–141, Oct. 2006.

MCALLISTER, M. M. et al. Rapid communication: dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473–1479, Sept. 1998.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 552–580, set./out. 2010.

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. 327–333, Sept. 2013.

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

MINEO, T. W. P. et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 98, n. 4, p. 239-245, July 2001.

MOFFETT, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 2, n. 9, p. 656-663, Sept. 2002.

MOOR, R. M.; ROWSON, L. E. A. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 2, p. 233-239, Feb. 1966.

MUNN, D. H. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, New York, v. 281, n. 5380, p. 1191–1193, Aug. 1998.

OROZCO, M. A.; MORALES, E.; SALMERÓN, F. Characterization of the inflammatory response in the uteri of cows infected naturally by *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 148, n. 2-3, p. 148–156, Feb. 2013.

PARE, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 1, p. 82–7, Feb. 1997.

PESCADOR, C. A. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 159-163, Nov. 2007.

PIRAINE, R. E. A. et al. The Potential of *Neospora caninum* immunogens against neosporosis. **Journal of Vaccines & Vaccination**, Oxford, v. 6, p. 1-10, Nov. 2015.

ROBERTS, C. J. Membrane protein sorting in the yeast secretory pathway: evidence that the vacuole may be the default compartment. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 119, n. 1, p. 69-83, Oct. 1992.

ROJO-MONTEJO, S. et al. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 7-16, Jan. 2009.

ROSBOTTOM, A. et al. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 219-228, Apr. 2007.

_____. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. e15799, Jan. 2011.

_____. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 76, n. 6, p. 2352–2361, June 2008.

SAMMIN, D. J. et al. Comparison of fetal and maternal inflammatory responses in the ovine placenta after experimental infection with *Chlamydia abortus*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 135, n. 2-3, p. 83–92, Aug./Oct. 2006.

SANTOLARIA, P. et al. Different humoral mechanisms against *Neospora caninum* infection in purebred and crossbred beef/dairy cattle pregnancies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 70–76, May 2011.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; SHER, A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 44–51, Feb. 1997.

SKOPETS, B. et al. Inhibition of lymphocyte proliferation by bovine trophoblast protein-1 (type 1 trophoblast interferon) and bovine interferon- α I. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 34, n. 1-2, p. 81-96, 1992.

SRINIVASAN, S. et al. Vaccination with microneme protein NcMIC4 increases mortality in mice inoculated with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 5, p. 1046-1055, Oct. 2007.

SZEKERES-BARTHO, J. et al. The role of γ/δ T Cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy: a review. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v. 42, n. 1, p. 44–48, July 1999.

THATCHER, W. W. et al. Interrelationships between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function in early pregnancy: sheep, cattle, pigs and horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 62, Suppl. 2, p. 25-46, 1986.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 552 p.

VANDER WIELEN, A. L.; KING, G. J. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrous cycle and early gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 2, p. 457-462, Mar. 1984.

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. 63-7, Jan. 2012.

WATHES, D. C.; LAMMING, G. E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 49, p. 53-57, 1995.

WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunology Today**, Amsterdam, v. 14, n. 7, p. 353-356, July 1993.

WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 61-67, Mar. 2006.

WILLIAMS, L. D. J. et al. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, London, v. 121, n. 4, p. 347-358, Oct. 2000.

WOUDA, W.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 3, p. 545-547, June 1997.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 - CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA
INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM CAPRINOS****(VERSÃO PRELIMINAR)**Escrito nas normas da *Revista Científica de Medicina Veterinária***CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA INFECÇÃO POR
Toxoplasma gondii EM CAPRINOS**

Débora Ribeiro ORLANDO¹, Ivam Moreira de OLIVEIRA Jr¹, Alinne Rezende de SOUZA¹, Luan Francisco dos Santos OLIVEIRA¹, Marcus Vinicius Lima NUNES¹, Tamires Goneli W. TEODORO¹, Angélica T B WOUTERS¹, Mary Suzan VARASCHIN^{2*}

RESUMO- *Toxoplasma gondii* é um parasito pertencente ao filo Apicomplexa que possui os felídeos como hospedeiros definitivos e aves e mamíferos como hospedeiros intermediários. Nos caprinos a toxoplasmose pode levar a abortos, natimortos, mumificação fetal e nascimento de crias debilitadas. O isolamento de parasitos viáveis de tecidos comestíveis, bem como de leite caprino revelam a importância desta espécie como fonte de infecção para os seres humanos. Desta forma, vários estudos tem sido realizados na tentativa de descrever quais são os fatores envolvidos na infecção por este protozoário. Este trabalho aborda aspectos clínicos patológicos da toxoplasmose e faz uma revisão das características epidemiológicas que podem ser favoráveis a infecção por *T. gondii*.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, cabras, epidemiologia, manejo.

ABSTRACT- *Toxoplasma gondii* is a parasite belonging to the Apicomplexa phylum that has the felids as definitive hosts and birds and mammals as intermediate hosts. In goats, toxoplasmosis can lead to abortion, stillbirths, fetal mummification and birth of weak goat kids. Isolation of viable parasites from edible tissues as well as goat milk reveals the importance of this species as a source of infection for humans. Thus, several studies have been carried out in an attempt to describe factors involved in the infection by this protozoan. This work addresses clinical pathological aspects of toxoplasmosis

and reviews the epidemiological characteristics that may be favorable for *T. gondii* infection.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*, goats, epidemiology, management.

INTRODUÇÃO

Toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Coccidia que apresenta uma distribuição cosmopolita (CARRUTHERS, 2002; CAVALCANTE & XIMENES, 1999). Este agente infecta o homem e uma infinidade de espécies animais, incluindo aves, mamíferos domésticos e silvestres (CAVALCANTE & XIMENES, 1999).

Caprinos são associados frequentemente a toxoplasmose humana, devido ao consumo de carne mal passada ou leite não pasteurizado, desta forma, este trabalho tem o objetivo descrever algumas características importantes dos aspectos clínicos patológicos e da epidemiologia da toxoplasmose em caprinos.

CICLO BIOLÓGICO E FONTES DE INFECÇÃO

Segundo Navarro (2002), o ciclo biológico desse protozoário ocorre em duas fases: uma assexuada, também denominada esquizogonia, e a fase sexuada ou enteroepitelial, que ocorre exclusivamente no gato e em outros felinos, denominados hospedeiros definitivos (HD). Nessa fase os microgametas fecundam os macrogametas formando oocistos, que são eliminados nas fezes do gato. Esses oocistos sofrem esporulação no ambiente e se tornam infectantes.

A fase assexuada ocorre em todos os hospedeiros intermediários (HI), inclusive nos felinos, e inicia-se após a ingestão do oocisto esporulado, presente na água e alimentos contaminados. No intestino ocorre ruptura do oocisto com liberação de oito esporozoítos, que se multiplicam no interior das células intestinais e nos linfonodos originando os taquizoítos, que por via hemolinfática alcançam diversos tecidos e órgãos nos quais se encistam e são denominados bradizoítos. O ciclo se completa quando o gato ingere cistos teciduais presentes em hospedeiros intermediários, frequentemente, ao se alimentarem de uma presa, já infectada (roedores e pássaros) (DUBEY, 1987).

O homem e os animais (carnívoros e omnívoros) podem se infectar com o *T. gondii* por meio do consumo de carnes ou seus derivados contendo cistos nas fibras musculares (NAVARRO, 2002; WILLIAMS et al., 2004), principalmente carnes cruas ou mal cozidas (DA SILVA e LANGONI, 2000; VITOR, 1992), ou ainda nas hortaliças, frutas, água ou até as mãos, contaminadas pelos oocistos esporulados. A ingestão de leite não pasteurizado e de seus derivados também se constitui num importante meio de infecção. Além destas formas, a transmissão do *T. gondii* pode ocorrer congenitamente, quando a mãe infecta-se agudamente durante a gestação, ou quando há reativação da infecção crônica em gestantes imunossuprimidas (NAVARRO, 2002; WILLIAMS et al., 2004). Quando ocorre transmissão transplacentária de taquizoítos ocorrem abortos, natimortos, debilidade neonatal, tanto no homem quanto nos animais, sendo a principal causa de perdas em rebanhos caprinos e ovinos (DUBEY et al., 1980).

Normalmente, o *T. gondii* infecta o seu hospedeiro sem causar sinais clínicos, porém é capaz de ter conseqüências graves, principalmente animais e pessoas imunossuprimidas (TENTER et al., 2000). Os caprinos são os animais domésticos mais seriamente acometidos e sua infecção, durante a prenhez, pode ocasionar morte embrionária precoce, morte fetal e reabsorção do feto, mumificação, natimortos abortos, morte perinatal ou o nascimento de animais debilitados (DUBEY, 1987). A forma de infecção disseminada é fatal, porém rara. Os sintomas clínicos variam de acordo com a quantidade de oocistos ingeridos e da virulência da cepa de *T. gondii*. Os caprinos apresentam piroxia, aumento de volume dos linfonodos, anemia, dispnéia, sinais de enterite e sintomatologia nervosa (DUBEY et al., 1987).

ASPECTOS CLINICOS PATOLÓGICOS DO *Toxoplasma gondii*

Normalmente, o *T. gondii* infecta o seu hospedeiro sem causar sinais clínicos, porém é capaz de ter conseqüências graves, principalmente animais e pessoas imunossuprimidas (TENTER et al., 2000). Os caprinos são os animais domésticos mais seriamente acometidos e sua infecção, durante a prenhez, pode ocasionar morte embrionária precoce, morte fetal e reabsorção do feto, mumificação, natimortos, abortos, morte perinatal ou o nascimento de animais debilitados, acarretando grandes perdas econômicas aos caprinocultores (DUBEY, 1987), sendo que a infecção de fêmeas soronegativas durante a gestação constitui o fator chave para a ocorrência destas patologias (DUNCANSON et al., 2001). A forma disseminada da toxoplasmose é

fatal, porém rara. Os sintomas clínicos variam de acordo com a quantidade de oocistos ingeridos e da virulência da cepa de *T. gondii*. Os caprinos apresentam pirexia, aumento de volume dos linfonodos, anemia, dispnéia, sinais de enterite e sintomatologia nervosa (DUBEY et al., 1987).

As lesões macroscópicas são caracterizadas pela presença de focos de necrose nos cotilédones (DUBEY, 1986; BUXTON, 1998) que se apresentam como pontos brancacentos medindo 1,0 mm de diâmetro (DUBEY, 1986), linfonodos mesentéricos pálidos e aumentados de volume, pulmões com consistência firme e com áreas claras intercaladas com áreas vermelhas (PESCADOR et al., 2007), assim como focos de necrose multifocal em vários tecidos. As lesões macroscópicas envolvendo o sistema nervoso são limitadas e incluem hiperemia, hemorragias submeningeanas ocasionais, infartos e edema cerebral (MCGAVIN e ZACHARY, 2013, p.175).

Microscopicamente, se observa áreas de necrose, inflamação em vários tecidos (DUBEY, 1986; PESCADOR et al., 2007) e calcificação, além de taquizoítos próximos a essas lesões (DUBEY, 1986; PESCADOR et al., 2007), ou cistos teciduais (PESCADOR et al., 2007). Porém, em razão de suas dimensões diminutas, os taquizoítos podem não ser percebidos em preparações histológicas coradas pelo H.E., embora possam ser identificados pela técnica de imuno-histoquímica (MCGAVIN E ZACHARY 2013, p.176). Nos fetos não existem lesões específicas podendo ocorrer inflamação e necrose em vários tecidos (DUBEY, 1986). Pescador et al., (2007) descreve meningoencefalite e mielite não supurativa multifocal com ou sem necrose, gliose multifocal, pneumonia

intersticial piogranulomatosa, pneumonia intersticial mononuclear com áreas de necrose, hepatite periportal, miocardite mononuclear, nefrite intersticial e linfadenite granulomatosa multifocal O diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado através das lesões microscópicas, PCR e teste imuno-histoquímico utilizando anticorpo policlonal anti-*T. gondii* (PESCADOR et al., 2007).

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Caprinos são frequentemente associados com fonte de infecção de *T. gondii* para humanos (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999). Este fato é justificado, pelo aumento do comércio de produtos de origem caprina, por algumas culturas acreditarem que o leite de cabra deva ser consumido cru (sem pasteurizar), assim como pelas atuais práticas “saudáveis” em que a carne deve ser ingerida crua (DJOKIĆ et al., 2014). Sendo importante ressaltar, que durante uma infecção aguda, *T. gondii* pode ser excretado no leite (DUBEY, 1980) e ser uma possível fonte de infecção para humanos, caso este não seja pasteurizado (SKINNER et al., 1990).

Na Etiópia, a soroprevalência em humanos para *T. gondii* é alta devido às circunstâncias precárias de vida e hábitos anti-higiênicos que facilitam a sobrevivência do protozoário. A taxa de pessoas contaminadas é mais alta no meio urbano do que no meio rural, isso porque a população de gatos é maior na cidade do que na área rural, devido a uma melhor disponibilidade de alimentos na cidade. Entre as pessoas soropositivas para toxoplasmose, 77,22 % admitiram comer carne crua, 75,44% ingeriram alimentos crus e 86,65% das pessoas não tinham água encanada

(GEBREMENDHIN e TADESSE, 2015). A implementação de medidas de saúde pública no que se refere ao consumo de carne cozida, lavar verduras e boas práticas de higiene poderia reduzir a transmissão do parasito e as conseqüências da infecção para o homem (GEBREMENDHIN e TADESSE, 2015).

A primeira evidência da toxoplasmose em caprinos foi registrada por Feldman & Miller (1956) nos Estados Unidos, desde então diversos inquéritos sorológicos têm sido realizados em vários países, inclusive no Brasil (AMARAL et al., 1978; MACHADO et al., 1987; CHIARI et al., 1987; SELLA et al., 1994; GONDIM et al., 1999; MAINARDI et al., 2003; SILVA et al., 2003; FIGLIUOLO et al., 2004; MACIEL & ARAÚJO, 2004; UZÊDA et al., 2004; CARNEIRO, 2006, p.98; FARIA et al., 2007, LIMA et al., 2008, VARASCHIN et al., 2011, PEREIRA et al., 2012, NUNES et al., 2013).

Uma técnica amplamente utilizada para determinar a freqüência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em caprinos é a RIFI (FIGLIUOLO et al., 2004; MACIEL & ARAÚJO, 2004; UZÊDA et al., 2004; FARIA et al., 2007). A soroprevalência deste protozoário em animais de produção é maior em suínos, ovinos e cabras (TENTER; HECKEROTH; WEIN, 2000). Além disso, a soroprevalencia costuma ser maior em ovelhas do que em cabras (HAMILTON et al., 2014; GEBREMENDHIN e TADESSE, 2015). Isso porque os caprinos tendem a comer folhas e galhos de arbustos mais altos, enquanto que os ovinos tendem a comer mais gramíneas sendo, portanto, mais susceptíveis a encontrar oocistos (HAMILTON et al., 2014).

A soroprevalência pode variar entre as diferentes regiões do Brasil. Em Pernambuco a porcentagem de caprinos positivos para *T gondii* foi de 31,8% (PEREIRA et al., 2012). Mossoró 92,8% das propriedades apresentaram, pelo menos, um animal positivo (LIMA et al., 2008), em estudos posteriores, a prevalência foi de 36,98% (NUNES et al., 2013). No sul de Minas Gerais a prevalência foi de 21,4% (VARASCHIN et al., 2011). Essas diferenças de soroprevalência em um mesmo país ou até mesma região ocorrem devido a alguns fatores que podem influenciar o ciclo do protozoário como, por exemplo, características dos animais selecionados para o estudo, período em que o estudo foi realizado, diferença nas condições climáticas, tipo de manejo realizado, e até mesmo técnicas sorológicas usadas para avaliar a soropositividade (NUNES et al., 2013).

Vários são os estudos realizados com intuito de descobrir quais são os fatores epidemiológicos (ou de risco) envolvidos na toxoplasmose. Alguns estudiosos apontaram o fato dos animais serem de raça pura (NETO et al., 2008; PEREIRA et al., 2012; NUNES et al., 2013), a convivência com outros animais como cavalos, ovelhas e suínos (PEREIRA et al., 2012; BAWAM, 2016), a fonte de água para os caprinos (NUNES et al., 2013) como bebedouros (NETO et al., 2008) ou fonte pública de água TZANIDASKI et al., 2012; DJOKIĆ et al., 2014), o fato de existir mais fêmeas contaminadas do que machos (NUNES et al., 2013; BAWM et al., 2016), entre outros.

Algumas explicações são apontadas para justificar estes fatores:

Uma maior positividade de fêmeas pode ser devido ao destino que os animais têm, enquanto as fêmeas são mantidas para fins reprodutivos

e/ou leite, os machos são vendidos ou abatidos (NUNES et al., 2013). Porém, Lima et al (2008) não observou diferença significativa entre a taxa de machos e fêmeas positivas.

Bawm et al (2016) notaram que o fato dos caprinos conviverem com várias outras espécies de animais, em um mesmo ambiente, aumentou em 25% a chance de serem positivos, uma vez que, há maior circulação de animais, mais resíduos de alimento, mais umidade (urina e água), contribuindo para a manutenção de cistos. Já para Bjokić et al (2014) não houve relevância o fato dos caprinos conviverem com outros animais.

Nunes et al (2013) observaram que a localização de vasilhames, para o lado de fora das instalações, aumentou o risco de infecção dos animais em 3,1 vezes. Estes vasilhames são mais acessíveis para os gatos errantes aumentando a chance dos caprinos entrarem em contato com oocistos do parasito. Alguns estudos relatam que a presença de gatos tem relação direta com uma maior taxa de animais positivos para *T. gondii* (NETO et al., 2008; CENCI-GOGA, 2013; BAWM et al., 2016). Em outros estudos não ocorreu uma relação estatística significativa com a presença de felídeos (LIMA, 2008; VARASCHIN et al., 2011; PEREIRA et al., 2012; NUNES et al., 2013; DJOKIĆ, KLUN et al., 2014). O acesso de gatos às águas dos animais e presença de felídeos selvagens foram fatores de risco em potencial para soroprevalência de *T.gondii* em rebanhos leiteiros da Itália (CENCI-GOGA, 2013) e Etiopia (GEBREMENDHIN et al., 2013).

Em relação à idade, animais acima de dois anos são mais susceptíveis a toxoplasmose (BAWM et al., 2016, VARASCHIN et al.,

2011, NETO et al., 2008), provavelmente por terem uma maior probabilidade de entrarem em contacto com o agente do que os animais mais novos.

Em relação a forma de criação dos caprinos, há discrepância nos resultados. Neto et al (2008) apontam como um fator de risco os caprinos serem criados no sistema semi intensivo, já Tzanidaski et al (2012) observaram que, tanto o sistema intensivo quanto o semi-intensivo, eram fatores de risco. Pereira et al (2012), já mostrou estatisticamente, que o sistema semi extensivo proporcionava uma maior chance desses animais se contaminarem. Por fim, Djokić; Klun; Musella (2014) colocam o sistema extensivo como o de maior risco já que os animais podem ter acesso a pastos contaminados.

O tipo de produção também interfere na taxa de animais positivos (NUNES et al., 2013). Para Pereira et al (2012) os animais destinados a produção de leite tiveram uma maior prevalência. Já para Djokić et al (2014) aqueles destinados a diferentes produções tinham uma maior prevalência. Neste estudo, cabras que eram usadas para outros propósitos, a soro prevalência foi 2,22 vezes maior do que para cabras que eram usadas somente para produção de leite. Isto pode ser explicado pelo tipo de manejo, onde em fazendas leiteiras ocorre uma maior adoção de medidas higiênica (DJOKIĆ et al., 2014). Já, no Paraná, em 30,71% dos animais soropositivos para toxoplasmose, não houve diferenças estatísticas significativas entre as categorias zootécnicas (SELLA et al., 1994).

No que diz respeito ao manejo, Bawm et al (2016) e Pereira et al (2012) relatam que um manejo de má qualidade é um fator de risco para a

contaminação dos animais. Pereira et al., (2012) observou que a frequência de animais soropositivos em criação de caprinos que realizaram a limpeza diária, semanal e mensal foram, respectivamente, 31,4%, 38,2% e 26,2%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De uma forma geral, fica claro que a incidência da toxoplasmose em caprinos pode ser reduzida com a adoção de medidas higiênicas na criação, assim como, evitar o contacto dos animais com ambientes úmidos e com felinos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, V., SANTOS, S.M., REBOUÇAS, M.M. Sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* e, soros de caprinos e ovinos procedentes respectivamente dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul. **Biológico**, v. 45, p. 331-340, 1978.

BAWM, S.B.; MAUNG, W.Y.; WIN, M.Y. et al. Serological Survey and factors associated with *Toxoplasma gondii* infections in domestic goat in Myanmar. **Scientifica**. v.2016, p.1-4, 2016.

BUXTON, D.; FINLAYSON, J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. **Journal Comparative Pathology**. v.96, n.3, p.319-333, 1986.

BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neosporacanium* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary Research BioMed Central**. v.29, 1998.

CARNEIRO, A.C.A.V. Soroepidemiologia da Toxoplasmose Caprina e Ovina no Estado de Minas Gerais. 2006. 116 f.Dissertação (mestrado em Parasitologia)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte, 116p.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**. v.81, n.2, p.111–122, 2002.

CAVALCANTE, A.C.R., XIMENES, L.J.F., Toxoplasmose caprina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.17, p.34-36, 1999.

CHIARI C. A, NEVES, D.P.Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.79, p.337-340, 1984

CHIARI, C.A., LIMA, W.S., ANTUNES, C.M.F. et al Soro-epidemiologia da toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 39, n. 4, p. 587-609, 1987.

CENCI-GOGA, B.T.; CIAMPELLI, A.; SECHI, P. et al. Seroprevalence and risk factor for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. **BMC Veterinary Research**. v.9, n.25, p.1-8, 2013.

DJOKIĆ, V.; KLUN, I.; MUSELLA, V. et al. Spatial epidemiology of *Toxoplasma gondii* infections in goats in Serbia. **Geospatial Health**. v.8, n.2, p.479-488, 2014.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P.; LOPES, C.W. et al. Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical signs and distribution of *Toxoplasma* in

tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal Veterinary Research.** v.41, n.7, p.1072-1076, 1980.

DUBEY, J.P. Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from goat. **American Journal Veterinary Research.** v.41, n.3, p.427-429, 1980.

DUBEY, J.P. Transplacental toxoplasmosis in goats. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology.** W.B. Sanders:Philadelphia. 1143p. p. 606-60, 1986.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in goats. In: Proceedings. In: **IV Internaciional Conference on Goats.** Brasília. p.513-20. 1987.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis-a waterbone zoonosis. **Veterinary Parasitology.** v.126, n.1-2, p.57-72, 2004.

DUBEY, J.P.; TIAO, N.; GEBREYES, W.A. et al. A review of toxoplasmosis in humans and other animals in Ethiopia. **Epidemiological Infections.** v.140, n.11, p.1935-1938, 2012.

DUCNANSON, P., TERRY, R.S., SMITH, J.E et al. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. **International Journal of Parasitology,** v. 31, p.1699- 1703, 2001.

ENGELAND, I.V.; WALDELAND, H.; KINDAHL, H. et al. Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the development of pregnancy and on endocrine foetal-placental function in the goat .**Veterinary Parasitology** , v.67, n.1-2, p.61-74, 1996.

ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S.W.; THOMSON, K. et al. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology.** v.86, n.3, p.155-171, 1999.

FARIA, E.B.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J. 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**. v.149, p.126-129, 2007.

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

GEBREMEDHIN, E.Z.; AGONAFIR, A.; TESSEMA, T.S. et al. Seroepidemiological study of ovine toxoplasmosis in East and West Shewa Zones of Oromia Regional State, Central Ethiopia. **BMC Veterinary Research**. v.9, n.117, p.1-8, 2013.

GEBREMEDHIN, E.Z.; TADESSE, G. A meta-analysis of the prevalence of *Toxoplasma gondii* in animals and humans in Ethiopia. **Parasites & Vectors**. v.8, n.291, p.1-9, 2015.

GONDIN, L.F.P., BARBOSA, JR., H.V., RIBEIRO FILHO, C.H.A. et al. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Vet. Parasitol**. v. 82, p. 273-276, 1999.

HAMILTON, C.M.; KATZER, F.; INNES, E.A. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in small ruminants from four Caribbean islands. **Parasites & Vectors**. v.7, n.449, p.1-4, 2014.

JONES, J.L.; DARGELAS, V.; ROBERTS, J. et al. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**. v.49, n.6, p.878-884, 2009.

LIMA, J.T.R.; AHID, S.M.M.; BARRÊTO JÚNIOR, R.A. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoro, Rio grande do Norte. **Brazilian veterinary Research animal Science**. v.45, n.2, p.81-86, 2008.

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

MACIEL, K.P., ARAUJO, F.A.P. Inquérito sorológico para detecção de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em caprinos (*capra hircus*) criados nos municípios de Gravataí e Viamão, região da grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages**, v.3, n.2, p. 121-125. 2004.

MAINARDI, R.S., MODOLO, J.R., STACCHINI, A.V.M. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dairy goats in the São Paulo State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n.6, p. 759-761, 2003.

MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J. Sistema Nervoso. **Bases da Patologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.p 774-872.

MILLER, J.K.; BLEWETT, D.A.; BUXTON, D. Clinical and serological response of pregnant gimmers to experimental induced toxoplasmosis . **Veterinary Record**. v.111, n.6, p.124-126, 1982.

NAVARRO, I.T. Toxoplasmose: Ciência e Mito Aspectos no homem e nos animais domésticos. In: **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro. P. 53-60, 2002.

NETO, J.O.A.; AZEVEDO, S.S.; GENNARI, S.M. et al. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.156, n.3-4, p.329-332, 2008.

NUNES, F.V.A.; VAEZ, J.R.; PINEHRIO, R.R. et al. Soroprevalência e fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos de propriedades rurais do município de Mossoró, RN. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.5, p.565-570, 2013.

PEACH, W.; FOWLER, J.; HAY, J. Incidence of *Toxoplasma* infection in a population of European starlings *Sturnus vulgaris* from central England. **Annals of tropical medicine and parasitology**. v.83, n.2, p.173-7, 1989.

PEREIRA, M.F.; PEIXOTO, R.M.; LANGONI, H. et al. Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.2, p.140-146, 2012.

PESCADOR, C.A., OLIVEIRA, E.C., PEDROSO, P.M.O. et al. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesq. Vet. Brás.** v.27, n.4, p. 167-171, 2007.

SELLA, M.Z.; VANARRO, I.T.; VIDOTTO, O. et al. Epidemiologia da toxoplasmose caprina: levantamento sorológico do *Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros na micro região de Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.3, n.1, p.13-16, 1994.

SILVA, A.V.; LANGONI, H. Foods of animal origin and human toxoplasmosis. **Higiene alimentar**. v.14, n.71, 2000.

SILVA, H.M. Transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* (Nicollle e Manceaux, 1909) em cabras experimentalmente reinfetadas. 2012.93 f.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária-UNESP, Jaboticabal. 2012.

SILVA, A.V., CUNHA, E.L.P., MEIRELES, L.R.et al.Toxoplasmose em ovinos e caprinos: Estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco Brasil. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.115-119, 2003.

SKINNER, L.J.; TIMPERLY, A.C.; WIGHTMAN, D. et al. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's Family. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v.22, n.3, p.359-361, 1990.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**. v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.

TZANIDAKIS, N.; MAKSIMOV, P.; CONRATHS, F.J. et al. *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices.**Veterinary Parasitology**. v.190, n.3-4, p.340-348, 2012.

UZÊDA, R.S., FERNÁNDEZ, S.Y., JESUS, E.E.V. et al.Fatores relacionados à presença de anticorpo IgG anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros do Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.5, n.1, p. 1-8, 2004.

VARASCHIN, M.S.; GUIMARÃES, A.M.; HIRSCH, C. et al. Fatores Associados a soroprevalência de *Neospora caninume* *Toxoplasma gondii*em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa veterinária Brasileira**. v. 31, n.1, p.53-58, 2011.

VITOR, R.W.A.O.; PINTO, J.B.; CHIARI, C.A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através da urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.43, n.2, p.147-154, 1991.

VITOR, R.W.A. Infecção experimental de caprinos por *Toxoplasma gondii*. 1992.176 f. Tese (Doutorado em Parasitologia)- Instituto de Ciências Biológicas-UFMG, Belo Horizonte. 1992.

WILLIAMS, R.H., MORLEY, E.K.; HUGHES, J.M. et al. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. **Parasitology**, v.103, p.301-307, 2004.

**ARTIGO 2 - PERFIL DE CITOCINAS EM CABRAS GESTANTES
NATURALMENTE INFECTADAS POR *Neospora caninum***

Artigo redigido de acordo com as normas para submissão no periódico
Plos One

**Perfil de citocinas em cabras gestantes naturalmente infectadas por
*Neospora caninum***

Resumo

Neospora caninum é um protozoário responsável por infecção congênita e abortos em ruminantes, no entanto, os mecanismos específicos causadores do aborto não estão bem elucidados. Alguns estudos correlacionam a participação de citocinas na polarização da resposta imune por células T auxiliares do tipo 1 (Th1), com produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), como fator desencadeante de eventos humorais e celulares específicos que causariam lesões, as quais poderiam levar ao aborto. Este estudo tem por objetivo quantificar a expressão de citocinas (interleucinas IL-4, IL-10, IL-12; e IFN- γ) pela técnica de ELISA no soro de nove cabras (sete positivas e 2 negativas) prenhes, de um rebanho de animais cronicamente infectados, congenitamente pelo *N. caninum* de forma a contribuir para o entendimento da resposta imunológica na neosporose em caprinos. Houve diferenças na produção de citocinas durante os cinco meses da gestação em cabras positivas e negativas para *N. caninum*, com valores maiores de IFN γ e IL-12 e menores de IL-4 e IL-10 em cabras infectadas por *N. caninum* em relação a cabras soronegativas, permitindo concluir que ocorreu polarização para uma resposta imune Th1. Há poucos estudos publicados sobre a resposta imunológica em animais infectados naturalmente por *N. caninum*, a maioria disponível foi realizada em bovinos e

com inoculação do parasito em diferentes fases de gestação [16,21-22]. Este é o primeiro estudo que demonstra os níveis de citocinas chaves durante a gestação em cabras naturalmente infectadas.

Keywords: Interleucina, Imunidade, Gestação, Neosporose.

Introdução

Neospora caninum é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório, que pode infectar várias espécies animais, dentre elas canídeos domésticos e selvagens, bovinos [1] e caprinos [2–4]. Este parasito possui eficiente capacidade de transmissão dentro do rebanho, podendo infectar até 90% dos animais [5].

Apesar do cão e outros carnívoros espalharem oocistos no ambiente e estes serem infectantes por via oral para outras espécies, a transmissão vertical de *N. caninum* é considerada a principal forma de infecção [6] em rebanhos bovinos leiteiros [7] e caprinos [4]. No entanto, a grande maioria dos animais nasce clinicamente sadia e eventos que transformam uma infecção aparentemente inofensiva em uma doença fatal ainda não estão claros [7].

A neosporose clínica em bovinos se manifesta por falhas reprodutivas, entre elas ocorrência de abortos, absorção embrionária, fetos mumificados ou macerados e nascimento de animais vivos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas permanentemente infectados [8]. Já em caprinos, além dos relatos de abortos ou falhas reprodutivas [3,4], é descrito o nascimento de animais não infectados por *N. caninum* [4].

Fisiologicamente, as fêmeas gestantes, por estarem gerando aloenxerto, desenvolvem resposta imunológica polarizada para o tipo Th2, com produção de

IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 [9]. Desta forma, as células trofoblásticas produzem IL-10, criando um ambiente de citocinas na interface materno-fetal, que polariza as células Th para o tipo Th2 [10]. A IL-10 consegue regular negativamente a produção de IFN- γ [11], o que pode facilitar a multiplicação de *N. caninum*, já que é uma citocina que age negativamente sobre a resposta Th1. A IL-10, juntamente com a IL-4, consegue neutralizar as citocinas inflamatórias.

Por outro lado, citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ , importantes para a polarização de células Th para Th1, são prejudiciais para *N. caninum*, mas podem induzir o aborto [12-13]. O IFN- γ é responsável por aumentar a expressão de MHC de classe II, favorecendo a apresentação de antígenos, aumentando assim a chance das células infectadas por *N. caninum* serem atacadas [13]. A IL-12 induz a produção de maior quantidade de IFN- γ , linfócitos T e *Natural Killer* (NK) [14]. Já o TNF- α ativa macrófagos e células NK [15]. Além das lesões induzidas na placenta, a resposta do tipo Th1 também é capaz de prejudicar a distribuição vascular de nutrientes favorecendo, ainda mais, a ocorrência de aborto [16].

Diante disso, se o sistema imune responde à infecção parasitária, ele pode prejudicar a gestação e ocasionar o aborto. Estudos imunológicos são cruciais para entender a patogênese da neosporose e a evolução da infecção, mas as investigações que abordam a imunidade do hospedeiro são um desafio [17]. A resposta imune do hospedeiro a *N. caninum* é, geralmente, estudada utilizando o

modelo bovino ou murino. Além disso, usa-se como via de infecção a parenteral ao invés da via entérica natural, relacionada à dificuldade de se obter oocistos de *N. caninum* [8]. Logo não se sabe se a resposta imunológica seria a mesma nas demais espécies, principalmente em animais naturalmente infectados.

Este trabalho tem por objetivo avaliar a resposta imunológica através da mensuração da expressão de citocinas no soro de cabras prenhes congenitamente infectadas por *N. caninum*.

Materiais e Métodos

Manejo das cabras

Neste estudo foram utilizadas nove cabras prenhes, com dois a quatro anos de idade, da raça Saanen, pertencentes ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras. Sete (Cabras 1-7) eram naturalmente infectadas por *N. caninum* e transmitiram verticalmente o parasito para seus filhotes em gestações anteriores, confirmadas previamente pela detecção do DNA do *N. caninum* na placenta e encéfalo dos fetos usando metodologia descrita [18]. Duas cabras eram negativas para *N. caninum* e foram utilizadas como controle negativo. Todas as cabras foram previamente testadas e são negativas para outros agentes causadores de aborto, como *Toxoplasma gondii*, *Brucella* sp,

Chlamydia abortus e *Coxiella burnetii*, assim como para o vírus da artrite e encefalite caprina.

As cabras foram mantidas em piquete telado durante o dia e em baias de alvenaria durante a noite. Foram alimentadas com feno, silagem e ração industrializada duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Além disso, passaram por exames clínicos e everminações periódicos.

Após detecção do estro foi realizada a cobertura por monta natural, com diagnóstico da gestação por ultrassonografia no dia 30 após a monta. Mensalmente foram realizados exames de ultrassonografia para monitorar a gestação. As cabras foram observadas diariamente até o 5º mês de gestação, com intuito de identificar quaisquer sinais de aborto e/ou outras alterações.

RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta)

A RIFI com quantificação dos anticorpos anti-*N. caninum* foi realizada utilizando amostras de soro de todas as cabras prenhes do experimento, obtido de sangue coletado uma semana antes da data prevista para o parto. Os resultados estão demonstrados na tabela 1.

ELISA

Mensalmente foram coletadas amostras de sangue das cabras prenhes até completarem cinco meses de gestação e os soros foram armazenados em

microtubos e mantidos a -20°C . Os soros de todas as coletas mensais foram submetidos à técnica de ELISA de competição para detecção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ . A técnica foi realizada utilizando kits específicos para cabras (Goat IL4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ Elisa kit, da empresa Neo Scientific, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e posterior leitura das placas em espectrofotômetro com 450nm de comprimento de onda com construção de curva padrão para cada citocina.

Análises estatísticas

Os dados referentes à dosagens de citocinas em cada mês de gestação de cabras positivas e negativas para *N. caninum* foram submetidos ao teste t de *student*. Também foi analisado o coeficiente de correlação de Pearson para os resultados de RIFI e citocinas. Quando os valores de p foram inferiores a 5% considerou-se diferença significativa. As análises dos dados foram realizadas utilizando o programa estatístico BioEstat 3.0 [19].

Resultados

Os resultados da RIFI para titulação de *N. caninum* das cabras estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Titulação de anticorpos anti-*N. caninum* no soro* coletado de cabras prenhes, por Reação de Imunofluorescência Indireta.

Cabra	Título
1	1:3200
2	1:3200
3	1:3200
4	1:800
5	1:800
6	1:400
7	1:400
8	Negativo
9	Negativo

* Coleta uma semana antes da data prevista para o parto

INF- γ

Nas cabras soronegativas para *N. caninum* foram detectados valores médios de INF- γ maiores que nas soropositivas no início da gestação e queda progressiva nesses valores até o final da gestação, com valores variando de 317 pg INF- γ /mL no início da gestação (mês 1) a 281 pg INF- γ /ml no final de gestação (mês 5) (Figura 1).

As cabras soropositivas tiveram valores de 314 pg IFN- γ /mL no mês um da gestação, sendo que a partir de dois meses e meio de gestação, a curva de INF- γ sempre foi superior a dos animais soronegativos, com valores maiores no mês 5 (305 pg/mL).

Foi observada diferença estatística significativa entre as concentrações de IFN- γ nos meses quatro e cinco de gestação, sendo os valores superiores nas

cabras positivas, em relação às cabras negativas para *N. caninum* ($p < 0,05$ - Figura 1 A).

IL-4

Durante todo o período de gestação os valores médios de IL-4 das cabras soronegativas foram superiores aos das soropositivas. Porém, houve diferença estatística significativa nos meses quatro e cinco de gestação nas cabras positivas quando comparadas às negativas ($p < 0,05$ – Figura 1 B).

TNF- α

No mês um da gestação as cabras apresentaram valores médios mais altos de TNF- α quando comparados ao mês cinco, com diferença estatística significativa no mês cinco. Neste período os valores de TNF- α foram inferiores nas cabras positivas (próximos de 280 pg/mL), quando comparados aos valores observados nas cabras soronegativas (próximo de 295 pg/mL) ($p < 0,05$ – Figura 1 C, Tabela 2).

IL-10

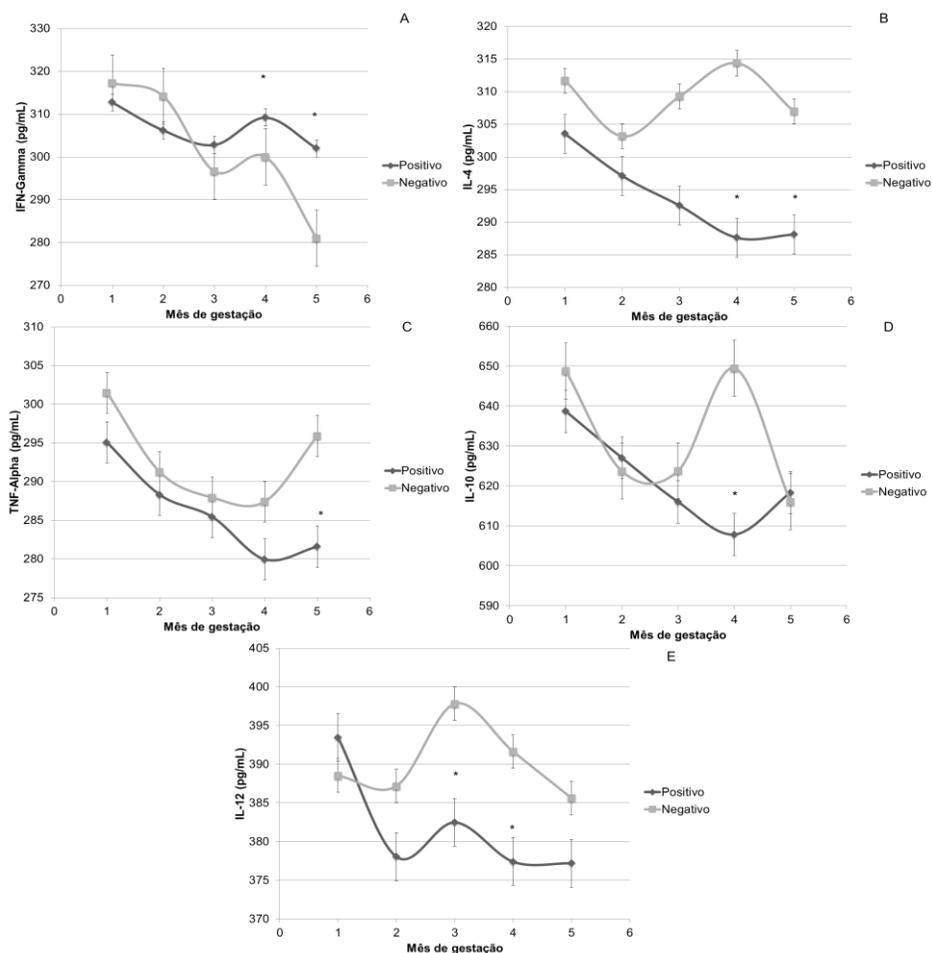
Nas cabras negativas ocorreu queda nos níveis médios de IL-10 (Figura 1D) no mês um da gestação, contudo houve elevação na curva aos dois meses e meio até o mês quatro (valores de 621 pg/mL a 650pg/mL), quando os valores

voltaram a decrescer. Nas cabras positivas ocorreu queda nos valores de IL-10 do mês um ao mês quatro de gestação (639 pg/mL a 607 pg/mL); e elevação a partir do mês quatro. Desta forma, somente no mês quatro houve diferença estatística significativa, em que os animais soropositivos apresentaram valores menores de IL-10 em relação aos animais negativos ($p < 0,05$ – Figura 1 D).

IL-12

Os valores médios de IL-12 sempre foram maiores nos animais soronegativos que nos positivos, exceto no mês um da gestação. No mês dois ocorreu elevação significativa nos valores dos animais negativos em relação aos positivos, atingindo valores máximos no mês três, com decréscimo no mês 4 para ambos os grupos. Do mês quatro para o mês cinco os animais positivos mantiveram valores constantes de IL-12, enquanto que nos animais negativos continuaram em queda. Porém só houve diferença estatística significativa nos níveis circulantes de IL-12, nos meses três e quatro. Neste período os valores de IL-12 foram inferiores nas cabras positivas ($p < 0,05$ – Figura 1 E).

Figura 1: Valores mensais de citocinas obtidos por ELISA em soro de cabras gestantes com e sem infecção congênita por *N. caninum*



DISCUSSÃO

Há poucos estudos publicados sobre a resposta imunológica em animais naturalmente infectados por *N. caninum*, a maioria disponível foi realizada em

bovinos e com inoculação experimental do parasito em diferentes fases de gestação [16,20-22].

A gestação é uma situação interessante do ponto de vista imunológico, em que citocinas colaboram com um papel importante na manutenção ou não da gestação [23]. Citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ , importantes para a polarização de células Th para Th1 e mais eficientes no controle da infecção por *N. caninum*, podem causar o aborto [12,13].

Neste estudo observou-se que cabras soropositivas para *N. caninum* tiveram níveis mais elevados de IL-12 no início da gestação (mês um) porém não houve diferença estatística nesses valores. Levando em consideração que a IL-12, produzida pelas células dendríticas, monócitos, macrófagos, linfócitos B e queratinócitos, faz com que as células Th0 se diferenciem em Th1 [24-25], pode se dizer que, nesta fase da gestação, os animais positivos já haviam formado uma resposta polarizada para o tipo Th1. A IL-12 induz a produção de maior quantidade de IFN- γ , linfócitos T e NK [14]. Outra questão importante é que, como não há, na literatura, valores de referência para IL em cabras soronegativas para *N. caninum*, não há como discutir a variação destas citocinas entre um animal prenhe e um não prenhe. Além disso, mesmo que os animais negativos tenham produzido maiores quantidades de IL-12, ao final da gestação eles já haviam polarizado uma resposta imunológica mais para o tipo Th2, o que não os fez mudar para o tipo Th1. Isso ocorre porque as células TCD4

estimuladas por antígenos conseguem secretar pequenas quantidades de IL-4, no início de sua ativação. O antígeno estando presente em altas concentrações, os níveis de IL-4 aumentam de forma gradual. Caso o antígeno não desencadeie uma resposta inflamatória com produção de IL-12, o resultando é uma resposta crescente do tipo Th2. Uma vez que ocorreu o desenvolvimento de células Th2, a IL-4 produzidas por elas mesmas, serve para amplificar a reação e inibir as respostas do tipo Th1 e Th17 [26].

Foi observada diferença estatística significativa entre os valores de IFN- γ , sendo esses valores mais elevados nas cabras positivas nos meses quatro e cinco da gestação, em relação às cabras soronegativas para *N. caninum*. IFN- γ juntamente com a IL-12 estimulam a diferenciação do Th1 ativando fatores de transcrição T-bet, STAT1 e STAT4. Isso ocorre porque IFN- γ ativa o fator de transcrição STAT1 que irá estimular a expressão de T-bet. Este, por sua vez, promove a produção de IFN- γ por ativação transcripcional direta de gene IFN- γ . Esta atividade é uma alça de amplificação positiva que induz a diferenciação das células T para Th1. A IL-12 ao se ligar a receptores das células TCD4, estimuladas por antígenos, ativam o fator de transcrição STAT4, intensificando ainda mais a produção de IFN- γ [26]. O IFN- γ é responsável por aumentar a expressão de MHC de classe II, favorecendo a apresentação de antígenos, aumentando, assim, à chance da célula infectada pelo parasito ser atacada pelo sistema imune [13]. IFN- γ leva a síntese da proteína denominada ativador de

transcrição de classe II (CIITA) que mantém o complexo de fatores de transcrição unidos (elas permanecem ligadas à esses fatores) atuando como importante regulador na expressão das moléculas de MHC de classe II. Além da indução de lesões na placenta, a resposta do tipo Th1 também é capaz de prejudicar a distribuição vascular de nutrientes, favorecendo a ocorrência do aborto nos animais positivos [16]. Então, pode se dizer que, nas cabras positivas, houve maior polarização para uma resposta Th1 no terço final da gestação, sugerindo que possa ter ocorrido maior apresentação de antígenos de *N. caninum* nesta fase.

Em ovelhas experimentalmente infectadas por *N. caninum* aos 40 dias de gestação a análise da resposta periférica mostrou que há forte produção de IFN- γ no início da gestação [27], resultado este semelhante ao do presente estudo. A proliferação de linfócitos e a diminuição na expressão de IFN- γ ocorre fisiologicamente na metade da gestação [28], queda esta observada até o mês três de gestação dos caprinos deste estudo, porém, do meio ao final da gestação os animais positivos produziram mais INF- γ do que os negativos. Innes et al. [28] observaram que há, na metade da gestação bovina, significativa regulação positiva para a produção de IFN- γ . Como a maioria dos abortos por *N. caninum* ocorre no terço final da gestação [8], a produção elevada de INF- γ poderia contribuir para a ocorrência do aborto [29]. Estudos *in vitro* demonstram que IFN- γ e TNF- α inibiram a multiplicação do parasito em fibroblastos e em

cultura de células cerebrais bovinas [30], mas por ser uma resposta inflamatória do tipo Th1, pode induzir a ocorrência de abortos [11].

Em condições fisiológicas as células trofoblásticas produzem IL-10, criando um ambiente de citocinas na interface materno-fetal que favorece a polarização das células T auxiliares para o tipo Th2 [10]. Esta citocina consegue regular negativamente a produção de IFN- γ [11], o que pode facilitar a multiplicação de *N. caninum*, já que é uma citocina que age negativamente sobre a resposta Th1. Neste estudo, as cabras infectadas com *N. caninum* produziram quantidades menores de IL-10 no mês cinco da gestação quando comparadas aos animais negativos, conseqüentemente ocorreu maior produção de INF- γ , sugerindo que houve polarização da resposta inflamatória para o tipo Th1 nos animais positivos. Esse evento pode ser uma resposta a uma reinfeção materna, já que houve maior produção de IL-10 (Th2) no início da gestação para reconhecimento da gestação, lembrando que a resposta Th2 facilita a saída de *N. caninum* do estágio de bradizoítos para taquizoítos [31].

A IL-4 consegue neutralizar as citocinas pró-inflamatórias, juntamente com a IL-10 [32]. No presente estudo foi observado um decréscimo nos níveis de IL-4 nos animais positivos do mês um ao mês cinco da gestação, com diferença estatística no mês cinco. Isto permite inferir que a maior produção de IL-4 e IL-10 (terço final da gestação nos animais negativos) levou a uma *down regulation* das citocinas que estimulam a resposta Th1, ou seja, houve menor

produção de INF- γ . Desta forma, infere-se que ocorrem altas taxas de INF- γ quando há baixa produção de IL-4. Williams et al. [33] relatam que essas variações entre as referidas citocinas, ao final da gestação, permite a transmissão congênita.

Diferente do presente estudo, Arranz-Solís et al. [27] não conseguiram detectar IL-4 em sangue periférico de ovelhas prenhes. Isto pode ter ocorrido devido à pouca produção de citocina pelos animais em seu experimento. Os perfis de resposta Th1 e Th2 são antagônicos [12] e os resultados do presente estudo demonstram essa situação;

Bartley et al. [21], ao inocularem taquizoítos em vacas com 70 dias de gestação, observaram que, 42 dias após inoculação (metade da gestação), IL-4 e IL-10, ambas citocinas Th2, estavam a níveis muito baixos em animais que abortaram. Já INF- γ apresentou níveis mais elevados aos 28 dias após inoculação, voltando a níveis basais no dia 56 pós-inoculação. Ou seja, no início da gestação o INF- γ estava em níveis elevados, mas abaixaram na metade da gestação, o que comprova resposta Th1 em início e Th2 em meados da gestação. Esses dados estão de acordo com os achados deste estudo, mas, estatisticamente só se pode inferir que ocorreu maior resposta Th1 nos animais positivos no terço final da gestação. Este fato poderia justificar perdas reprodutivas observadas em caprinos em experimento que descreve natimortos e abortos no terço final da gestação (4).

Conclusão

Caprinos soropositivos para *N. caninum* tiveram níveis mais elevados de citocinas do tipo Th1 do que os soronegativos, principalmente no terço final da gestação.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo apoio fornecido.

Referências

1. Andreotti R, Barros JC, Pereira AR, Oshiro LM, Cunha RC, Figueiredo Neto LF. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2010;19: 119–123.
doi:10.4322/rbpv.01902010

2. Dubey JP, Dubey J. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol. 2003;41: 1–16. doi:10.3347/kjp.2003.41.1.1
3. Varaschin MS, Hirsch C, Wouters F, Nakagaki KY, Guimarães AM, Santos DS, et al. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. Korean J Parasitol. 2012;50: 63–7. doi:10.3347/kjp.2012.50.1.63
4. Mesquita LP, Nogueira CI, Costa RC, Orlando DR, Bruhn FRP, Lopes PFR, et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. Vet Parasitol. 2013;196: 327–333. doi:10.1016/j.vetpar.2013.03.002
5. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. J Comp Pathol. 2006;134: 267–289. doi:10.1016/j.jcpa.2005.11.004
6. Almeria S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. Parasit Immunol. 2003;25: 383–92. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521581>
7. Macalodowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, et al. Placental Pathology Associated with Fetal Death in Cattle Inoculated with *Neospora caninum* by Two Different Routes in Early Pregnancy. J Comp Pathol. 2004;131: 142–156. doi:10.1016/j.jcpa.2004.02.005
8. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals—The last five years. Vet Parasitol. 2011;180: 90–108. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.031
9. Mesquita Júnior D, Araújo JP, Catelan TTT, Souza WS, Cruvinel WM, Andrade LEC, Silva NP. Immune System – Part II Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. Rev Bras Reumatol. 2010; 50: 552–580. doi.org/10.1590/S0482-

50042010000500008.

10. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993;14: 353–356.
doi:10.1016/0167-5699(93)90235-D
11. Entrican G. Immune Regulation during Pregnancy and Host–Pathogen Interactions in Infectious Abortion. *J Comp Pathol*. 2002;126: 79–94.
doi:10.1053/jcpa.2001.0539
12. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*. 1997;18: 478–82. Available:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9357139>
13. Piraine REA, Silva RAE, Junior AGDS, Cunha RC, Leite FPL. The Potential of *Neospora caninum* Immunogens against Neosporosis. *J Vaccines Vaccin*. 2015;6: 1–10. doi:10.4172/2157-7560.1000298
14. Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol*. 1999;29: 1635–46. Available:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608450>
15. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect Genet Evol*. 2013;13: 133–150. doi:10.1016/j.meegid.2012.08.012
16. Cantón GJ, Katzer F, Maley SW, Bartley PM, Benavides-Silván J, Palarea-Albaladejo J, et al. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. *Vet Res. BioMed Central*; 2014;45: 11. doi:10.1186/1297-9716-45-11
17. Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Šlapeta J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum*

- infection in wildlife. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2015;4: 216–238. doi:10.1016/j.ijppaw.2015.04.002.
18. Orlando DR, Costa RC, Soares BA, Oliveira NSC, Nascimento LC, Peconick AP et al. *Neospora caninum* abortions in cattle in southern Minas Gerais, Brazil. *Pesqui Veterinária Bras. Colégio Brasileiro de Patologia Animal*; 2013;33: 1332–1338. doi:10.1590/S0100-736X2013001100008
 19. Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2003. p. 290.
 20. Klevar S, Kulberg S, Boysen P, Storset AK, Moldal T, Björkman C, et al. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *Int J Parasitol.* 2007;37: 329–339. doi:10.1016/j.ijpara.2006.11.002
 21. Bartley PM, Wright SE, Maley SW, Macaldowie CN, Nath M, Hamilton CM, et al. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. *Vet Res. BioMed Central*; 2012;43: 38. doi:10.1186/1297-9716-43-38
 22. Cantón GJ, Katzer F, Benavides-Silván J, Maley SW, Palarea-Albaladejo J, Pang Y, et al. Phenotypic characterisation of the cellular immune infiltrate in placentas of cattle following experimental inoculation with *Neospora caninum* in late gestation. *Vet Res.* 2013;44: 60. doi:10.1186/1297-9716-44-60
 23. Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJL, Conrad PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 2002;18: 497–504. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473366>
 24. Khan IA, Schwartzman JD, Fonseca S, Kasper LH. *Neospora*

- caninum:Role for immune cytokines in host immunity. *Exp Parasitol.* 1997;85: 24–34. doi:10.1006/expr.1996.4110
25. Nishikawa Y, Tragoolpua K, Inoue N, Makala L, Nagasawa H, Otsuka H, et al. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clin Vaccine Immunol.* 2001;8: 811–817. doi:10.1128/CDLI.8.4.811-817.2001
 26. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology.* 8 th. Elsevier, editor. Philadelphia: Saunders; 2011.
 27. Arranz-Solís D, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Horcajo P, Castaño P, del Carmen Ferreras M, et al. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Vet Res. BioMed Central;* 2016;47: 2. doi:10.1186/s13567-015-0290-0
 28. Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, et al. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 2001;31: 1523–34. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595240>
 29. Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolds J, et al. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J Am Vet Med Assoc.* 1993;202: 113–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8420896>
 30. Innes EA, Panton WR, Marks J, Trees AJ, Holmdahl J, Buxton D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *J Comp Pathol.* 1995;113: 95–100. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7490344>

31. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* Elsevier; 1996;67: 1–59. doi:10.1016/S0304-4017(96)01035-7
32. Tizard IR. *Veterinary immunology.* Elsevier/Saunders; 2013.
33. Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, et al. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitol.* 2000;121: 347–58. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11072897>

**ARTIGO 3 - EVENTOS IMUNOPATOLÓGICOS EM PLACENTA DE
CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS POR *Neospora caninum***

(VERSÃO PRELIMINAR)

Escrito nas normas da *Pesquisa Veterinária Brasileira*

Eventos imunopatológicos em placenta de cabras naturalmente infectadas por *Neospora caninum*¹

Débora R. Orlando², Mary S. Varaschin^{3*}

ABSTRACT: Orlando D.R., Varaschin MS [Immunopathological events in the placenta of goats naturally infected by *Neospora caninum*]. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001 - Kennedy, Lavras - MG, 37200-000, Brazil. E-mail: msvaraschin@dmv.ufla.br

The neosporosis in goats has been related to the occurrence of abortions, stillbirths and birth of weak goats. The aim of this study was to characterize, by immunohistochemistry (IHC), the inflammatory cells in the placenta of goats naturally infected with *N. caninum*, associating the infection to lesions. For this purpose were euthanized seven positive goats for *N. caninum* and two negative, at end of the fifth month of pregnancy. Anti-*N. caninum* antibodies in the serum of these goats were measured by the Indirect fluorescent antibody tests (IFAT). Placentomas samples were fixed in zinc salts and 10% formaldehyde for histological evaluation and by IHC. No goat miscarried and only one goat presented macroscopic lesions in placenta, characterized by placentomes with enhanced edges, irregular and edematous, corioalantoidea membrane with edema near to the cotyledons and multifocal petechiae. Microscopically, in the positive animals, were observed discrete multifocal infiltrate of lymphocytes, macrophages and rare neutrophils in the trophoblastic mesenchyme and multifocal mineralization. One goat showed areas of necrosis of the chorionic epithelium, multifocal and moderate infiltrate of lymphocyte, plasma cells and macrophages in the uterine submucosa. Only in one goat placenta were visualized multiple cysts of *N. caninum*, confirmed by IHC. The immunolabelling were positive for T lymphocytes (CD3), T helper (CD4), *Natural Killer* (CD335), T-gamma-delta ($T\gamma\delta$), B lymphocytes (CD79), macrophages, INF- γ and MHC-II. Statistical differences were found in the amount of labeled cells between positive and negative animals. In addition, there was a positive correlation between the results of IFAT and, respectively, the amount of CD3 lymphocytes, $T\gamma\delta$ and macrophages. There was also observed a positive correlation between the values of $T\gamma\delta$ with the amount of CD3 and macrophages. Additionally, a positive correlation was observed between CD4 and *NK* lymphocytes, demonstrating the participation of these cells in the local immune response.

INDEX TERMS: Immunohistochemistry. Neospora. Placenta. Injuries. Goats.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Bacharelado em Ciências Agrárias, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Avenida Vereador João Narciso, 1080, Cachoeira, Unaí, MG38610, Brasil.

² Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001 - Kennedy, Lavras - MG, 37200-000.

*Autor para correspondência:mavaraschin@dmv.ufla.br

RESUMO: A neosporose em caprinos tem sido relacionada à ocorrência de abortos, natimortos e ao nascimento de cabritos fracos. O objetivo deste estudo foi caracterizar por imuno-histoquímica (IHQ) a presença de células inflamatórias, INF- γ e MHC-II na placenta de cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, associando a infecção às lesões encontradas. Foram submetidas a eutanásia sete cabras positivas para *N. caninum* e duas negativas, ao final do quinto mês de gestação. Os anticorpos anti-*N. caninum* no soro dessas cabras foram mensurados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Amostras de placentomas foram fixadas em solução de sais de zinco e em formol 10% para avaliação histológica e por IHQ. Nenhuma cabra abortou e somente uma cabra teve alterações macroscópicas na placenta, caracterizadas por cotilédones com bordas aumentadas, irregulares e edemaciados, membrana corioalantoidea com edema próximo aos cotilédones e petéquias multifocais. Microscopicamente havia, nos animais positivos, infiltrado multifocal discreto a acentuado de linfócitos, macrófagos e raros neutrófilos no mesênquima trofoblástico e áreas de calcificação multifocal. Em um caprino foi observado áreas de necrose no epitélio coriônico e infiltrado linfoplasmocitário e de macrófagos difuso moderado na submucosa uterina. Somente na placenta de uma cabra foram visualizados vários cistos de *N. caninum*, confirmados pela IHQ. Pela marcação IHQ foram evidenciados linfócitos T (marcador CD3), linfócitos T auxiliares (marcador CD4), linfócitos B (marcador CD79), Tgamma delta (T $\gamma\delta$), *Natural Killer* (NK, marcador CD335), macrófagos (marcador anti-lizosima), INF- γ e MHC-II presentes na interface placentária

materno-fetal. Foram constatadas diferenças estatísticas na quantidade de células marcadas entre animais positivos e negativos. Houve também correlação positiva entre os valores de $T\gamma\delta$ e os de CD3 e macrófagos. Além disso, houve correlação positiva entre os resultados de RIFI e, respectivamente, a quantidade de linfócitos CD3, $T\gamma\delta$ e macrófagos. Adicionalmente, foi observada correlação positiva entre linfócitos CD4 e células *NK*, demonstrando a participação dessas células na resposta imune local.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Imuno-histoquímica. Neosporose. Placenta. Lesões. Cabras.

INTRODUÇÃO

N. caninum é um parasito intracelular obrigatório, considerado um dos principais agentes causador de abortos em bovinos em todo o mundo. O parasito tem como hospedeiros definitivos canídeos domésticos e selvagens e foi isolado de várias espécies animais (Dubey & Schares 2011).

A neosporose clínica em bovinos se manifesta por falhas reprodutivas, entre elas a ocorrência de abortos recorrentes, geralmente no período de 5 a 6 meses de gestação, absorção embrionária, fetos mumificados ou macerados, nascimento de animais vivos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas permanentemente infectados (Dubey & Schares 2011). Em caprinos, além dos relatos de abortos ou falhas reprodutivas (Varaschin et al. 2012, Mesquita et al. 2013), há descrição de nascimento de animais não infectados por *N. caninum* (Mesquita et al. 2013).

Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de se explicar a ocorrência ou não desses abortos. Orozco et al. (2013) estudaram as lesões e as células inflamatórias em tecido uterino de bovinos infectados por *N. caninum*. Observou-se que o agente pode se encistar em endométrio e miométrio no intuito de esperar por um momento propício para infectar o feto. Além disso, foi possível observar que a grande quantidade de células inflamatórias nesse tecido é constituída principalmente de macrófagos e linfócitos. Porém, são células que naturalmente estão presentes em úteros saudáveis de animais prenhes e não prenhes e, além do mais, macrófagos também possuem papel de reparação celular, com importante função no debridamento de células da placenta. Bartley et al. (2013) descreveram a resposta sorológica de bovinos e fetos. Nesse estudo concluíram que ambos (feto e mãe) conseguem desenvolver resposta imunológica inata e adaptativa humoral e mediada por células contra *N. caninum*. Além disso, também foi possível observar que o feto e a mãe desenvolvem respostas diferentes, dependendo da fase de gestação.

A imunidade do hospedeiro contra a neosporose é um desafio que precisa ser melhor estudado, pois são utilizados, normalmente, modelo bovino ou murino e as conclusões destes estudos não podem ser extrapoladas para outras espécies (Donahoe et al. 2015). Além disso, diferenças na suscetibilidade à infecção por *Neospora* têm sido observado entre diferentes raças bovinas (Bartels et al. 2006).

Somado a isto, muitos estudos usam taquizoítos isolados e inoculados via parenteral e não da forma natural em que a doença ocorre (Donahoe et al. 2015).

Este trabalho tem por objetivo caracterizar por IHQ a presença de células inflamatórias, INF- γ e MHC-II na placenta ao final da gestação de cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manejo dos caprinos e coleta de materiais. As cabras deste estudo pertencem a um rebanho caprino naturalmente infectado por *N. caninum*, pertencente ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras. Para o presente estudo foram selecionadas nove cabras (sete positivas e 2 negativas). Todas foram mantidas em piquete telado durante o dia e em baias de alvenaria durante a noite, foram alimentadas com feno, silagem de milho e ração industrializada duas vezes ao dia e recebiam água *ad libitum*. Além disso, passaram por exames clínicos e everminação periódicos.

Após detecção do estro foi realizado cobertura por monta natural. A gestação foi diagnosticada através de ultrassonografia no dia 30 após a monta, seguido do monitoramento mensal para avaliar a viabilidade fetal. As cabras foram observadas diariamente até o final do quinto mês de gestação com o intuito de identificar quaisquer sinais de aborto e/ou outras alterações clínicas.

Foi realizada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) do soro coletado de todas as cabras uma semana antes da data prevista para o parto para mensuração dos anticorpos anti-*N.caninum*.

Ao completar cinco meses de gestação os animais foram submetidos a eutanásia por sedação e anestesia profunda (Projeto aprovado pela Comissão de ética no uso de animais –UFLA protocolo 036/14). Na necropsia foram coletados fragmentos de cinco placentomas e área adjacente de cada cabra e fixados em solução fixadora de sais de zinco (Trizma base 0,1M, acetato de cálcio 0,05%, acetato de zinco 0,5%, cloreto de zinco 0,5%) por 72 horas, conforme descrito por Breugelmans et al. (2011); e em formol 10% tamponado. Amostras de útero foram também colhidas em formol 10% para histologia. Tecido placentário e encéfalo dos fetos foram coletados, armazenados a -20°C, para realização de PCR, conforme protocolo descrito por Orlando et al. (2013).

Todas as cabras selecionadas para o estudo foram previamente testadas e são negativas para outros agentes causadores de aborto, como *Toxoplasma gondii*, *Brucella sp*, *Chlamydia abortus* e *Coxiella burnetti*, assim como para o vírus da artrite e encefalite caprina.

Exame histopatológico. Fragmentos de placentomas e adjacências e útero foram processados rotineiramente para a histopatologia. A pesquisa de estruturas de *N. caninum* e avaliação de lesões histopatológicas foram realizadas por microscopia ótica. As lesões das placentas foram descritas e classificadas conforme

o tipo e localização do infiltrado inflamatório, presença ou não de necrose e intensidade das lesões.

Imuno-histoquímica. Cortes dos placentomas e área adjacente foram submetidos à marcação IHQ com o anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum* produzido em cabras (VRMD, Pullman, USA), conforme descrito por Varaschin et al. (2012). Amostras destes tecidos também foram marcadas com os anticorpos monoclonais utilizados para bovinos e com reação cruzada para cabras, para linfócitos T (CD3), $\gamma\delta$, NK (CD335), linfócitos B (CD79), macrófagos (anti-lisozima), MHC-II e policlonais para linfócitos T auxiliares (CD4) e INF- γ nas diluições de 1:50 como descrito por Maley et al. (2006). A IHQ foi realizada utilizando um kit comercial (LSAB+Kit, Peroxidase, Dako Corporation, Carpinteria, USA) contendo anticorpo secundário conjugado com biotina e streptavidina conjugada com peroxidase. Para a reativação antigênica as lâminas foram submersas em tampão citrato (pH 6,0) seguido da irradiação em micro-ondas na potência máxima por três minutos. As células marcadas foram quantificadas em cinco campos microscópicos selecionados de forma aleatória, na objetiva de 40x.

Análise Molecular. Das amostras de placenta ou encéfalo foi extraído o DNA, usando um kit comercial (wizard SV Genomic Purification System, Promega, Madison, WI, USA) após lise com proteinase K. Para detectar *N. caninum* foram usados os primers baseados no cromossomo XII (forward 5'-CTGTTAGAAGGTGCGGCGAA-3' e reverse 5'-TCTCTTGCTGCGGTGGAAAT-3'), como descrito por Orlando et al. (2013), que amplificam um fragmento de 168 pares de base. Após a realização da PCR e da eletroforese, foi extraído as amostras da banca com posterior sequenciamento genômico do material seguindo o protocolo de Orlando et al (2013).

Análises estatísticas. Os dados não paramétricos, referentes à contagem de células das cabras com diferentes titulações (1:3200; 1:800; 1:400 e negativas) para *N. caninum*, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Quando os valores de p foram inferiores a 5% considerou-se diferença significativa. Para os parâmetros de RIFI e IHQ, foi analisado o coeficiente de correlação de Pearson. Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico BioEstat 3.0 (Ayres et al.,2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da titulação de anticorpos anti-*N. caninum* antes do parto pela técnica de RIFI estão demonstrados no Quadro 1. Todas as placentas e os fetos foram positivos para *N. caninum* na PCR.

Somente a cabra 1 apresentou lesões macroscópicas na placenta, caracterizadas por cotilédones com bordas aumentadas, irregulares e edemaciados, membrana corioalantoidea com edema próximo aos cotilédones e petéquias multifocais (Figura 1). Microscopicamente observaram-se áreas multifocais de necrose de

epitélio coriônico (cabra 1), infiltrado inflamatório constituído por poucos neutrófilos (cabra 1) linfócitos, macrófagos e plasmócitos (Quadro 1, Figura 2) no mesênquima embrionário da vilosidade coriônica e porção coriônica (cabras 1, 3, 4, 5 e 6). Este infiltrado foi acentuado nas cabras 1 e 3, já nas outras foi discreto a moderado. Na submucosa uterina havia infiltrado difuso moderado de macrófagos e linfócitos. Somente na cabra 1 foram visualizados vários cistos compatíveis com *N. caninum* (Figura 3) e taquizoítos, confirmados na marcação IHQ (Figura 4). Em todas as placentas havia mineralização multifocal. Nos animais negativos foi observado apenas áreas multifocais de calcificação e raras células inflamatórias (Tabela 1).

As lesões placentárias descritas em bovinos são mais acentuadas no início da gestação (Macaldowie et al. 2004, Maley et al. 2006) e consistem de áreas de necrose em cotilédones, os quais chegam a se separar das carúnculas, associadas a infiltrado inflamatório não supurativo no mesênquima fetal e de neutrófilos, monócitos e macrófagos nas carúnculas (Macaldowie et al. 2004), assim como ocorre necrose de vilosidade fetal e inflamação em septo materno ou em todo o placentoma (Maley et al., 2006). No presente estudo as lesões foram semelhantes, porém ocorreram em intensidades diferentes e não foi possível precisar com certeza em que fase da gestação ocorreu a infecção. Mesquita et al. (2013), utilizando cabras da primeira geração do rebanho aqui estudado, descreveu, nas placentas de cabras que abortaram ou pariram natimortos, lesões acentuadas de necrose, envolvendo mesênquima dos vilos e células trofoblásticas, além de infiltrado linfoplasmocitário, por vezes associado a neutrófilos. Nas cabras deste estudo, provavelmente já está ocorrendo adaptação de *N. caninum* ao hospedeiro.

Estruturas de *N. caninum* foram visualizadas somente na cabra 1, que teve uma das titulações anti-*N. caninum* mais elevadas e lesões macro e microscópicas na placenta, permitindo concluir que o parasito foi responsável pelas lesões encontradas. Desta forma, assim como o observado no estudo de Arranz-Solís et al (2015), acredita-se que os demais caprinos do presente estudo conseguiram construir uma resposta imune eficaz em controlar parcialmente a proliferação do agente

No Quadro 2 são demonstrados os resultados da imunomarcagem nas placentas das cabras. Linfócitos T (Figura 5), citotóxicos (Figura 6) e NK (Figura 7) ocorreram em porção coriônica, vilosidade coriônica e mesênquima embrionário. Linfócitos B (Figura 8) e macrófagos (figura 9), foram visualizados, também no epitélio de criptas. Os linfócitos $T\gamma\delta$ foram evidenciados em epitélio de cripta, mesênquima embrionário e vilosidade coriônica (Figura 10). Já a expressão de IFN só ocorreu na porção coriônica (Figura 11) e do MHC-II no mesênquima embrionário e vilosidade coriônica (Figura 12).

O número médio de células marcadas na IHQ está demonstrado no Quadro 2. Houve diferença estatística quando se comparou as médias de linfócitos T entre os animais negativos e os que possuíam título de 1:3200 a 1:800. O número médio de macrófagos marcados foi superior nas cabras com título 1:3200 ou 1:800, quando comparadas com as de título 1:400. Com relação ao número linfócitos $T\gamma\delta$,

observaram-se maiores valores em cabras 1:3200 em comparação às cabras com 1:400 e negativas.

Ocorreu correlação positiva significativa entre os resultados de RIFI e, respectivamente, linfócitos T, macrófagos e $\gamma\delta$ (Quadro 3); entre $\gamma\delta$ e macrófagos; e entre linfócitos T auxiliares e NK. Para os linfócitos T auxiliares, não houve diferença estatística entre os grupos, como também observado no estudo de Klevar et al. (2007) e Cantón et al. (2013). Estudos em ovelhas (Arranz-Sólís et al. 2016) bovinos (Maley et al. 2006, Cantón et al. (2013) e búfalos (Cantón et al. 2014), descrevem linfócitos T e T auxiliares nas placentas, mas o número de Linfócitos T foi significativamente maior em animais infectados, comparados aos animais negativos. Os linfócitos T e T auxiliares estavam nas carúnculas e ao redor de focos necróticos das carúnculas ou de vilosidades fetais de búfalas prenhes (Maley et al. 2006). Cantón et al. (2014) observaram que estas células estavam em maior quantidade em vacas prenhes inoculadas no início e na metade da gestação. Após uma infecção por *N. caninum*, os linfócitos T auxiliares levaram a uma resposta do tipo Th1 produzindo citocinas como INF- γ , TNF- α e IL-12, que têm papel essencial na imunidade protetora contra o agente (Tuo et al. 2004), mas podem causar aborto (Chaouat et al. 1990).

Raras células expressando INF- γ foram evidenciadas na porção coriônica, de forma que não houve diferença estatística entre as médias dos valores e nem mesmo uma correlação entre os componentes estudados, sugerindo chance elevada de ocorrer parasitemia e transmissão congênita de *N. caninum*. Esta baixa expressão de INF- γ também é descrita em ovelhas (Arranz-Solís et al. 2016). O INF- γ inibe a multiplicação intracelular de *N. caninum* (Innes et al. 1995) e níveis elevados desta citocina pode aumentar os índices de apoptose de células infectadas (Nishikawa et al. 2001), além de aumentar a expressão de MHC-II, favorecendo a apresentação de antígenos e aumentando a chance das células infectadas de serem reconhecidas por meio de uma resposta citotóxica (Goodswen et al. 2014). Sinergicamente, TNF- α pode surgir na resposta por meio da ativação de macrófagos e células NK (Goodswen et al. 2014) e, concomitantemente, tem-se aumento de IL-12, que induzirá maiores quantidades de IFN- γ (Baszler et al. 1999).

As células marcadas pela expressão de CD335, ou seja, as NK são as primeiras células a produzirem INF γ (Korbel et al. 2004) e são consideradas as mais importantes no início de uma resposta inata (Carayannopoulos & Yokoyama 2004). Não ocorreram diferenças estatísticas entre as médias dos valores obtidos para células NK, porém na Cabra 3 foi observado infiltrado intenso dessas células. Outro fato interessante é que houve correlação positiva entre os valores de CD4 e NK. Células NK foram demonstradas nas carúnculas de vacas gestantes (Cánton et al. 2013), e numa maior quantidade em placentas bovina de fetos mortos (Maley et al. 2006). As NK possuem duas principais funções efetoras: produção de citocinas e lise de células alvo (Korbel et al. 2004). No início de uma resposta imunológica, patógenos invasores são capturados por células apresentadoras de antígenos, que liberam citocinas para a ativação de NK (Klevar et al. 2007). Boysen et al. (2006) demonstraram que, nos bovinos, as NK produziram INF- γ após estimulação direta com taquizoítos de *N. caninum*, ou por contato com células infectadas, levando à

sua morte. Neste estudo, apesar da ativação de células NK em algumas cabras (Quadro 2, Figura 7) não foi possível observar expressão aumentada de INF- γ .

No presente estudo, linfócitos B foram observados em pequenas quantidades na porção coriônica, na vilosidade coriônica, no mesênquima embrionário e no epitélio de criptas e não estavam associadas a lesões. Houve diferenças significativas em seus valores. Os animais negativos e positivos com titulação de 1:800 tiveram média maior de células marcadas quando comparados aos animais com titulação de 1:3200. Adicionalmente, os animais com título de 1:400 apresentaram menores médias para linfócitos B em relação aos negativos e com titulação de 1:800. Estudos em ovinos (Arráns-Solis et al. 2016) e bovinos (Maley et al. 2006, Cantón et al. 2013), descrevem raros linfócitos B na placenta, assim como a ausência de diferença estatística para estas células entre animais negativos e positivos para *N. caninum*, independente das diferentes vias de inoculação e no fato de albergarem fetos mortos ou vivos (Maley et al. 2006). Desta forma, essas células provavelmente não possuem um papel crucial na imunopatogênese da neosporose em ruminantes em relação a alterações morfológicas na interface materno-fetal.

A função dos linfócitos T $\gamma\delta$ em doenças infecciosas em diferentes espécies de animais é desconhecida, mas lesões iniciais de necrose em placenta foram associadas a menores quantidades destas células (Maley et al. 2003). Por se encontrarem em superfícies mucosas, elas podem fazer parte da primeira linha de defesa contra patógenos (Entrican 2002). Elas também têm a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias (Raghupathy 1997), mas seu papel na infecção por *N. caninum* ainda não é conhecido (Maley et al. 2006).

Quando *N. caninum* acomete uma fêmea em início de gestação ocorre infiltrado moderado de T $\gamma\delta$ na placenta, que pode aumentar quando há um feto morto (Maley et al. 2006). No presente estudo observaram-se valores estatisticamente significativos na titulação de 1:3200 em comparação às cabras com título 1:400 e negativas. Desta forma, pode se dizer que, quanto maior for o título, mais células T $\gamma\delta$, macrófagos, CD3 estarão presentes. No estudo de Maley et al. (2006) e Cantón et al. (2014) essas células representavam uma minoria e estavam adjacentes a lesões de necrose das vilosidades e base de carúncula. Cantón et al. (2014) observaram maiores valores para T $\gamma\delta$ em búfalas com fetos mortos.

Os macrófagos placentários fetais podem ter origem tanto do mesênquima coriônico no início da gestação quanto derivados da medula óssea de fetos em um período mais adiantado da gestação. São responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e têm a função de células apresentadoras de antígenos. Desta forma, sugere-se que elas possam funcionar como células sentinelas, sendo importantes tanto na defesa fetal quanto na transmissão transplacentária de agentes patogênicos (Schlafer et al. 2000). Os macrófagos também desempenham papel fundamental no processo de reparação tecidual (Leibovich & Ross 1975). No presente estudo o número médio de células marcadas foi superior nos animais com titulação de 1:3200 e 1:800. Essas células encontravam-se em porção coriônica, vilosidade coriônica, mesênquima embrionário e em criptas. Provavelmente no presente estudo, os macrófagos evidenciados pela imuno-histoquímica possuem

papel na proteção conta o agente já que não foram evidenciadas necrose na interface materno-fetal da maioria dos animais em questão

Arranz-Sólis et al. (2016) observaram macrófagos em todas as placentas de ovinos, mesmo em diferentes fases de gestação. Enquanto nos animais positivos estas células estavam presentes nos tecidos fetal e materno, assim como na área de contato entre ambos na placenta, nos animais negativos foram encontrados apenas na base dos placentomas. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, em que essas células encontravam-se apenas na cripta dos animais negativos. Cantón et al. (2013) observaram em vacas prenhes inoculadas aos 210 dias de gestação, infiltrado de macrófagos mais evidente nos animais eutanasiados em uma fase mais recente. Essas células marcadas encontravam-se na carúncula materna e, por vezes, infiltravam vilosidades fetais. Aos 42 e 56 dias após inoculação eles observaram que essas células se mantinham ao redor de pequenas áreas de necrose da carúncula materna e das vilosidades fetais.

No presente estudo não houve diferenças estatísticas entre as médias de células marcadas para MHC -II e nem mesmo alguma correlação. O que se observou é que essas estruturas celulares estavam presentes em células do mesênquima embrionário e vilosidade coriônica. Em vacas saudáveis o MHC de classe II, além de ser expresso nas células apresentadoras de antígenos, também é expresso por poucas células fibroblásticas e uma alteração nesse padrão de expressão de moléculas MHC de classe II é vista em vacas infectadas por *N. caninum*, principalmente ao redor de focos de necrose da placenta. Desta forma, sua expressão pela placenta é correlacionada com a ocorrência de abortos por *N. caninum* (Rosbottom et al. 2011). Provavelmente, neste estudo, devido à baixa quantidade de INF γ no tecido placentário não houve grande expressão de MHCII.

CONCLUSÕES:

Houve imunomarcagem de linfócitos T, linfócitos T auxiliares, NK, linfócitos B, macrófagos, linfócitos T $\gamma\delta$, MHC-II e INF- γ na interface materno-fetal de cabras naturalmente infectadas por *Neospora caninum*. Correlação positiva significativa entre os títulos das cabras para *N. caninum* com a presença de linfócitos T, T $\gamma\delta$ e macrófagos, e de linfócitos T com macrófagos. Adicionalmente, foi observada correlação positiva entre linfócitos T auxiliares e NK, indicando provável participação dessas células na resposta imune local.

Agradecimento:

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro. A CAPES pela bolsa de doutorado

REFERÊNCIAS:

- Arranz-Solís D., Benavides J., Regidor-Cerrillo J., Fuertes M., Ferre I., Ferreras M., Collantes-Fernández E., Hemphill A., Pérez V., Ortega-Mora L.M. 2015. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. *Vet. Res.* 46(19):2-13.
- Arranz-Solís D., Benavides J., Regidor-Cerrillo J., Horcajo P., Castaño, P., Ferreras M.C., Jiménez-Pelayo L., Collantes-Fernández E., Ferre, I., Hemphill A., Pérez V., Ortega-Mora L.M. 2016. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Veterinary Research.* 47 (2):2-13.
- Ayres M., Ayres-Jr M., Ayres D.L., Santos A.S. 2003. Bioestat 3.0- Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. p. 151-205.
- Bartels C.J.M., Van Schaik G., Veldhuisen J.P., Van den Borne B.H.P., Wouda W, Dijkstra T. 2006. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. *Prev. Vet. Med.* 77(3-4):186–198.
- Bartley P. M., Katzer F., Rocchi M.S.; Maley S.W., Benavides J., Nath M., Pang Y., Cantón G., Thomson J., Chianini F., Innes E.A. 2013. Development of maternal and foetal immune responses in cattle following experimental challenge with *Neospora caninum* at day 210 of gestation. *Veterinary Research.* 44 (91):1-14.
- Bartley P., Kirvar E., Wright S., Swales C., Esteban-Redondo I., Buxton D., Maley S.W, Schock A., Rae A.G., Hamilton C., Innes E.A. 2004. Maternal and Fetal Immune Responses of Cattle Inoculated with *Neospora caninum* at Mid-Gestation. *Journal of Comparative Pathology.* 130 (2):81–91.
- Baszler T. V., Long M.T., McElwain T.F, Mathison B.A. 1999. Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology.* 29 (10):1635–1646.
- Boysen P., Klevar S., Olsen I., Storset A.K. 2006. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infection and Immunity.* 74(2):953–60.
- Breugelmans S., Van den Broeck W., Demeyere K., Meyer E., Simoens P. 2011. Immunoassay of lymphocyte subsets in ovine palatine tonsils. *Acta Histochemica.* 113 (4):416–422.
- Cantón G. J., Katzer F., Benavides-Silvan J., Maley S.W, Palarea- Albaladejo J., Pang Y., Smith S., Bartley P.M., Rocchi M., Innes E.A., Chianini F. 2013. Phenotypic characterisation of the cellular immune infiltrate in placentas of cattle following experimental inoculation with *Neospora caninum* in late gestation. *Veterinary Research.* 44 (60):1-10.

- Cantón G. J., Kartzler F., Maley S.W., Bartley P.M., Benavides-Silvan J., Palarea-Albaladejo J., Pang Y., Smith S.H., Rocchi M.S., Buxton D., Innes E.A., Chianini F. 2014. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. *Veterinary Research*. 45 (1): 1-5.
- Carayannopoulos L.N., Yokoyama W.M. 2004. Recognition of infected cells by natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol*. 16(1):26–33.
- Chaouat G., Menu E., Clark D.A., Dy M., Minkowski M., Wegmann T.G. 1990. Control of foetal survival in CBA X DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J. Reprod. Fertil*. 89(2):447–453.
- CDonahoe S.L., Lindsay S.A., Krockenberger M., Jan Šlapeta D.P. 2015. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4(2):216–238
- Dubey J.P., Scharles G. 2011. Neosporosis in animals-The last five years. *Veterinary Parasitology*. 180 (1): 90–108.
- Entrican G. 2002. Immune regulation during pregnancy and host–pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of Comparative Pathology*. 126 (2-3):79–94.
- Goodswen S.J., Kennedy P.J., Ellis J.T. 2014. . Discovering a vaccine against Hein W. R., Mackay C. R. 1991. Prominence of gd Tcells in the ruminant immune system. *Immunology Today* 12 (1): 30-34.
- Innes E.A., Panton W.R., Marks J., Trees A.J., Holmdahl J., Buxton D. 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *Journal of Comparative Pathology*. 113(1):95-100.
- Klevar S., Kulberg S., Boysen P., Storset A.K., Moldal T., Björkman C., Olsen I. Natural killer cells act as early responders in na experimental infections with *Neospora caninum* in calves. 2007. *International Journal for Parasitology*. 37 (3-4):329-339.
- Korbel D.S., Finney O.C., Riley E.M. 2004. *Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens*. *Int. J. Parasitol*. 34(13-14):1517-28.
- Leibovich S.J., Ross R. 1975. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol*. 78(1):71–100.
- Macaldowie C., Maley S.W., Wright S., Bartley P., Esteban-Redondo I., Buxton D., Innes E.A. 2004. Placental Pathology Associated with Fetal Death in Cattle Inoculated with *Neospora caninum* by Two Different Routes in Early Pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*. 131(2):142–156.
- Maley S.W., Buxton D., Era A.G., Wright S.E., Schock A., Bartley P.M., Esteban-Redondo I., Swales C., Hamilton C.M., Sales J., Innes E.A 2003. The Pathogenesis of Neosporosis in Pregnant Cattle: Inoculation at Mid-gestation. *J. Comp. Path*. 129(2-3):186–195.

- Maley S.W., Buxton D., Macalodowie C.N., Anderson I.E., Wright S.E., Bartley P.M., Esteban-Redondo I., Hamilton C.M., Storset A.K., Innes E.A. 2006. Characterization of the Immune Response in the Placenta of Cattle Experimentally Infected with *Neospora caninum* in Early Gestation. *Journal of Comparative Pathology*. 135 (2): 130–141.
- Mesquita L.P., Nogueira C.I., Costa R.C., Orlando D.R., Bruhn F.R.P., Lopes P.F.R., Nakagaki K.Y.R., Peconick A.P., Seixas J.S., Bezerra Júnior P., Raymundo D.L., Varaschin M.S. 2013. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 196 (3-4):327-333.
- Nishikawa Y., Tragoolpua K., Inoue n., Makala l., Nagasawa H., Otsuka H., Mikami T. 2001. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal Immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8(4):811-816.
- Orozco M.A., Morales E., Salmerón F. 2013. Characterization of the inflammatory response in the uteri of cows infected naturally by *Neospora caninum*. *Journal of Comparative Pathology*. 148 (2): 148–156.
- Raghupathy R. 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*. 18 (10): 478–482.
- Rosbottom A., Gibney H., Kaiser P., Hartley C., Smith R.F., Robinson R., Kipar A., Williams D.J. 2011. Up Regulation of the Maternal Immune Response in the Placenta of Cattle Naturally Infected with *Neospora caninum*. *PLoS ONE*. 6 (1): e15799-15808.
- Schlafer D.H., Fisher P.J., Davies C.J. 2000. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Animal Reproduction Science*. 2(60–61):145–160.
- Tuo W., Davis W.C., Fetterer R., Jenkins M., Boyd P.C., Gasbarre L.C., Dubey J.P. 2004. Establishment of *Neospora caninum* antigen-specific T cell lines of primarily CD4+ T cells. *Parasite Immunol*. 26(5):243–246.
- Varaschin M.S., Hirsh C., Wouters F., Nakagaki K.Y.R., Guimarães A.M., Santos D.S., Bezerra Júnior P.S., Costa R.C., Peconick A.P., Langohr I.M. 2012. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. *Korean Journal of Parasitology*. 50 (1): 63-67.

TABELAS E FIGURAS:

Tabela 1: Média do número de células inflamatórias, IFN γ e MHC-II, em cinco campos, marcadas por IHQ na placenta de cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*

Cabra	Titulação	Marcador CD3 (LT)	Marcador CD4 (LT auxiliares)	Marcador CD79 (LB)	Marcador CD335 (NK)	IFN γ	Macrófago	T $\gamma\delta$	MHC-II
1	1:3200	145	10	0	7	0	61	5	1
2	1:3200	94	1	0	0	1	73	13	0
3	1:3200	191	74	3	218	0	22	9	27
4	1:800	111	11	4	0	1	19	5	7
5	1:800	81	11	5	15	0	45	4	27
6	1:400	6	5	0	5	0	5	0	0
7	1:400	28	19	0	9	2	6	0	0
8	Negativo	5	11	4	14	0	9	0	1
9	Negativo	4	10	3	13	0	7	0	0

LT: linfócitos T; LB: linfócitos B

Tabela 2: Média do número de células marcadas na imuno-histoquímica em cabras prenhas com diferentes titulações para *Neospora caninum*

nº de células (média ± dp)	Titulação			
	1:3200	1:800	1:400	Negativa
Marcador CD3	143.0 (± 32.9)	96.0 (± 10.0)	17.0 (± 7.3)*	4.6 (± 0.4)*#
Marcador CD4	28.3 (± 30.4)	11.3 (± 0.4)	12.0 (± 4.6)	10.6 (± 0.4)
Marcador CD79	1.0 (± 1.3)	4.3 (± 0.4)*	0.0 (± 0.0)#	4.3 (± 0.4)†
Marcador CD335	75 (± 95.3)	7 (± 5.1)	7 (± 1.3)	14 (± 0.4)
IFNY	0.3 (± 0.4)	0.3 (± 0.4)	1.0 (± 0.7)	0.0 (± 0.0)
Macrófagos	52.0 (± 20.0)	32.0 (± 8.6)	5.6 (± 0.4)*#	8.6 (± 0.4)
Tγδ	9.0 (± 2.7)	5.0 (± 0.6)	0.0 (± 0.0)*	0.0 (± 0.0)*
MHC-II	9.3 (± 11.7)	17.0 (± 6.7)	0.3 (± 0.4)	0.7 (± 0.4)

* Diferença no número de células em relação à titulação de 1:3200 (p < 0.05).

Diferença no número de células em relação à titulação de 1:800 (p < 0.05).

† Diferença no número de células em relação à titulação de 1:400 (p < 0.05).

Tabela 3: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de titulação por reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e imuno-histoquímica em cabras naturalmente infectadas por *Neospora caninum*.

8

	RIFI	CD3	CD4	CD79	CD335	INFY	Macrófago	Tγδ	MHC
RIFI	1.00								
CD3	0.84*	1.00							
CD4	0.37	0.60	1.00						
CD79	- 0.40	-0.01	0.18	1.00					
CD335	0.44	0.61	0.98*	0.17	1.00				
INFγ	- 0.05	-0.08	- 0.14	- 0.38	- 0.26	1.00			
Macrófago	0.76*	0.54	- 0.19	- 0.25	- 0.10	- 0.04	1.00		
Tγδ	0.86*	0.74*	0.26	- 0.16	0.35	0.07	0.76*	1.00	
MHC	0.24	0.56	0.65*	0.55	0.67*	- 0.32	0.10	0.31	1.00

* Correlação significativa (p < 0,05)



Figura 1. Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 1 – Cotilédones edemaciados, com bordas aumentadas, irregulares e com petéquias (seta). Membrana corioalantoidea com edema próximo aos cotilédones e petéquias multifocais (cabeça de seta).

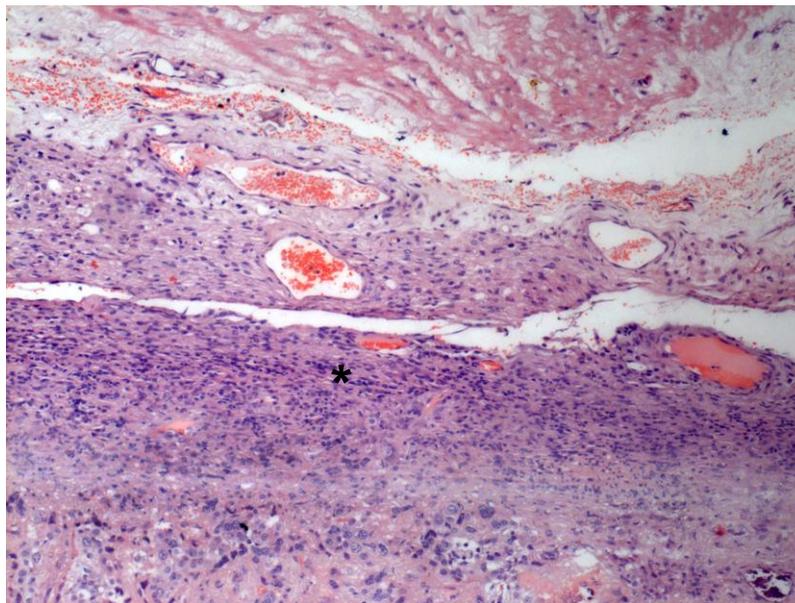


Figura 2. Neosporose em cabras. Útero e placenta, Cabra 1. Fotomicrografia mostrando placentoma em transição corioalantoidea (*) com infiltrado linfocitoplasmocitário (HE, Obj. 10)

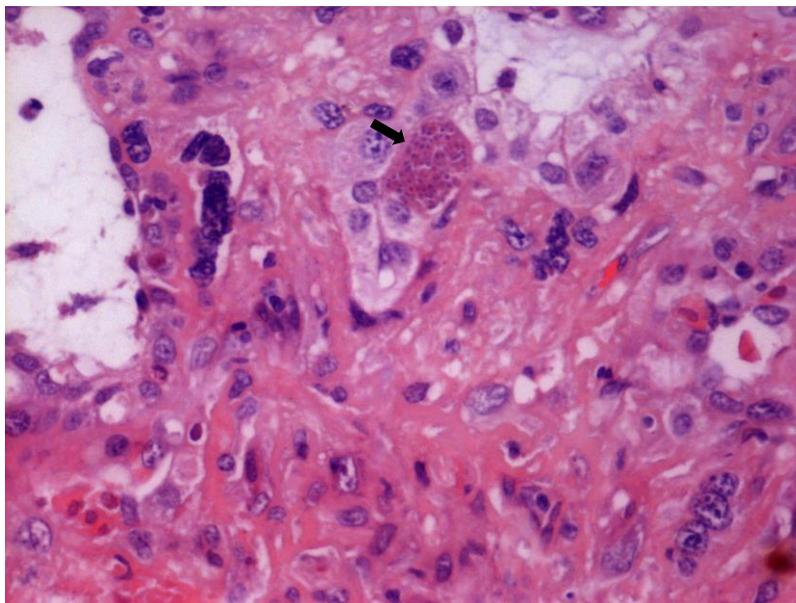


Figura 3 – Neosporose em cabras. Cabra 1 . Cisto de *Neospora caninum* na placenta (seta). (HE,Obj.40)

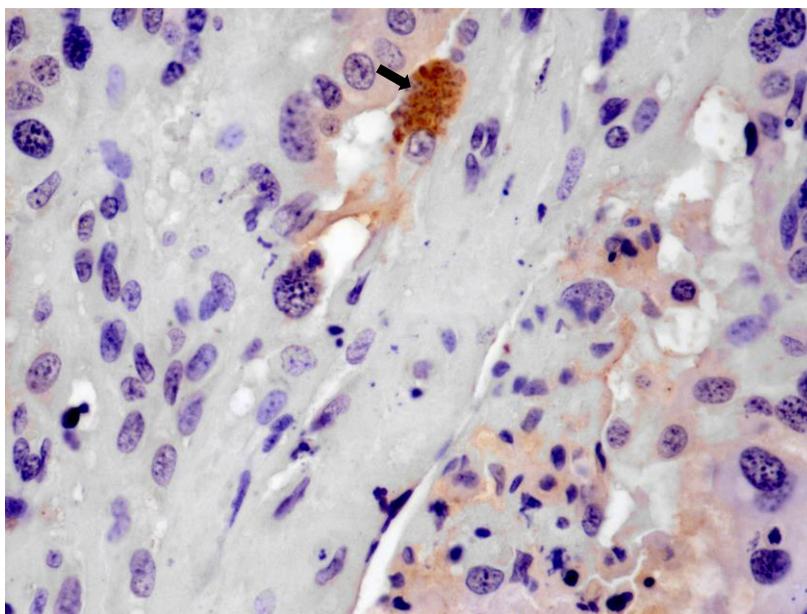


Figura 4. Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 1. Tachizoítos de *Neospora caninum* (seta) (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Obj.40)

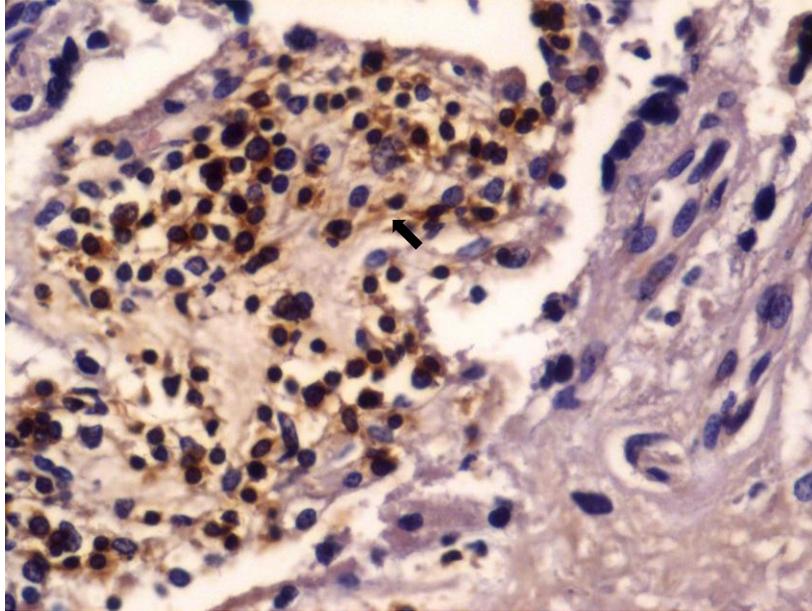


Figura 5: Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 3, imunomarcção de linfócitos T (marcador CD3), no mesênquima embrionário (seta). (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Obj.40).

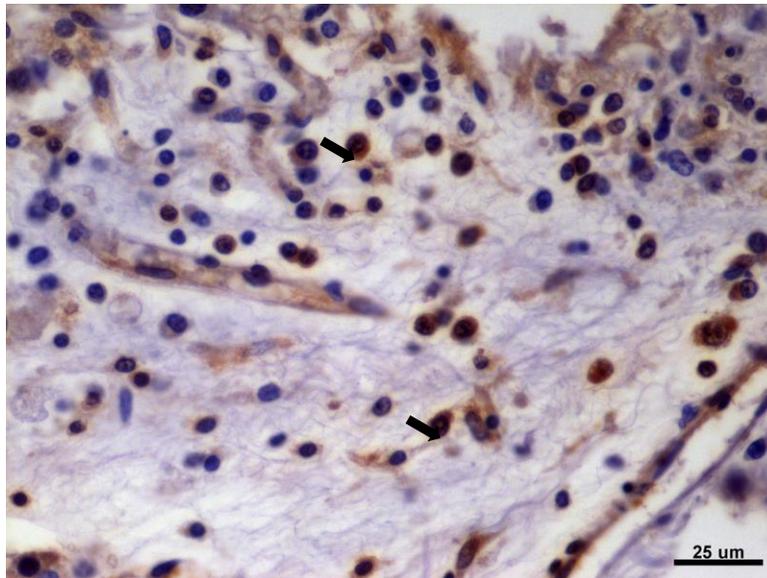


Figura 6: Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 3. Imunomarcção de linfócitos T auxiliar (marcador CD4) no mesênquima embrionário (setas). (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 25 μ m, Obj.40).

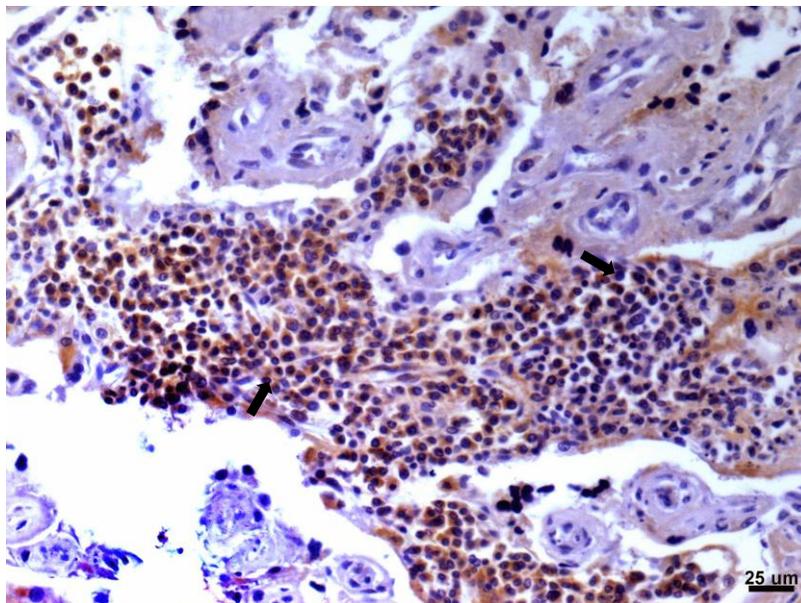


Figura 7. Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 3. Imunomarcção de células *Natural Killer* (marcador CD 335) no mesênquima embrionário (setas). (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 25 μ m, Obj.20)

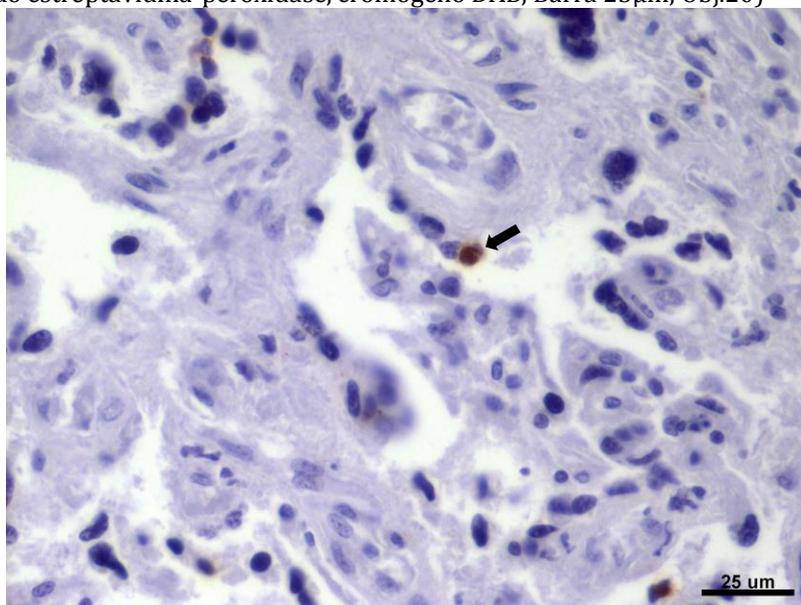


Figura 8. Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 5. Imunomarcção para linfócitos B (marcador CD79) (seta) em criptas. (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 25 μ m, Obj.40)

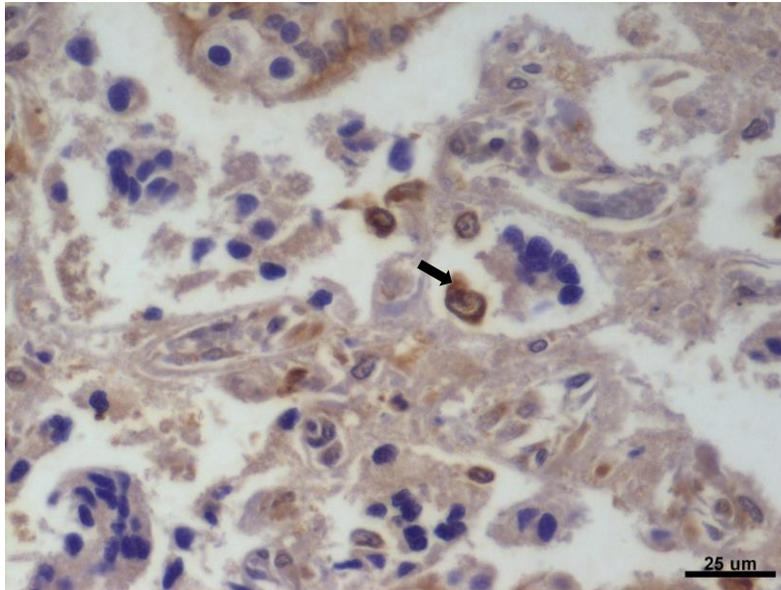


Figura 9. Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 4. Imunomarcaco de macrófagos nas criptas (seta). (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 25μm, Obj.40).

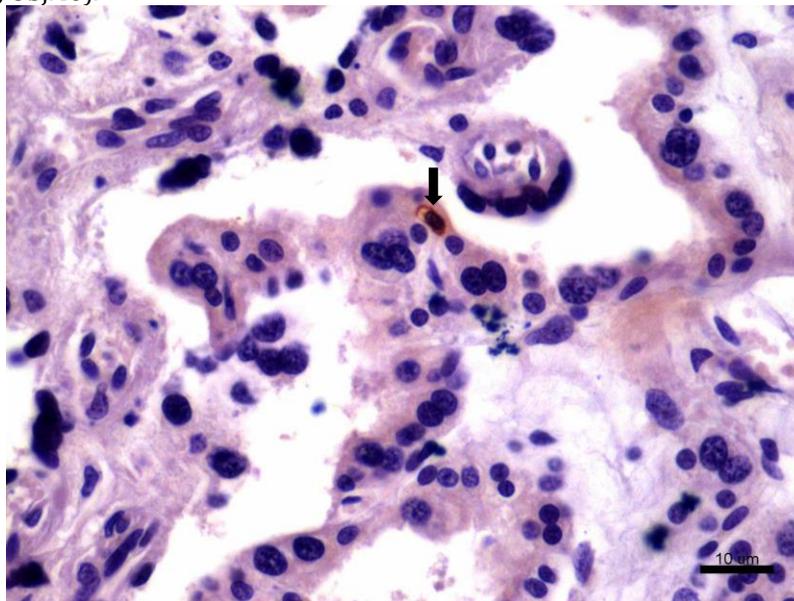


Figura 10. Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 2. Imunomarcaco para linfócitos Tγδ nas criptas (seta). (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 10μm, Obj.40).

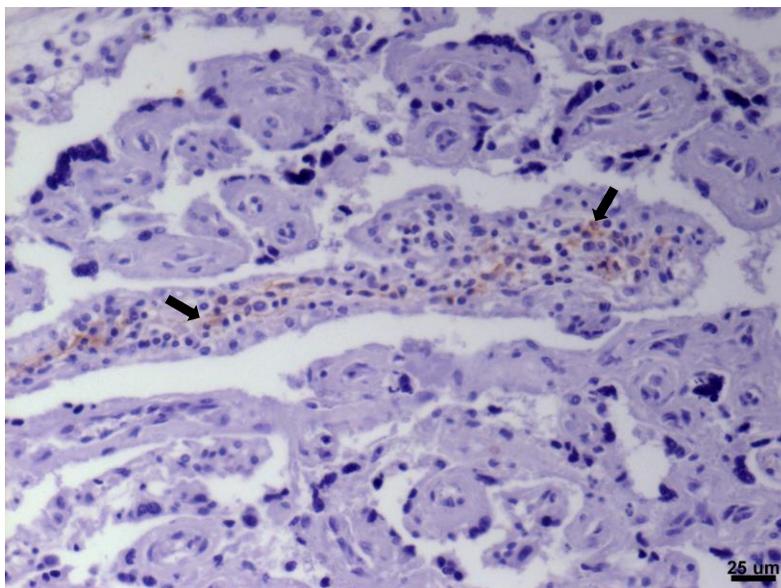


Figura 11. Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 5. Imunomarcação de MHC-II em mesênquima embrionário (setas). (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB. Barra 25 μm, Obj.20).

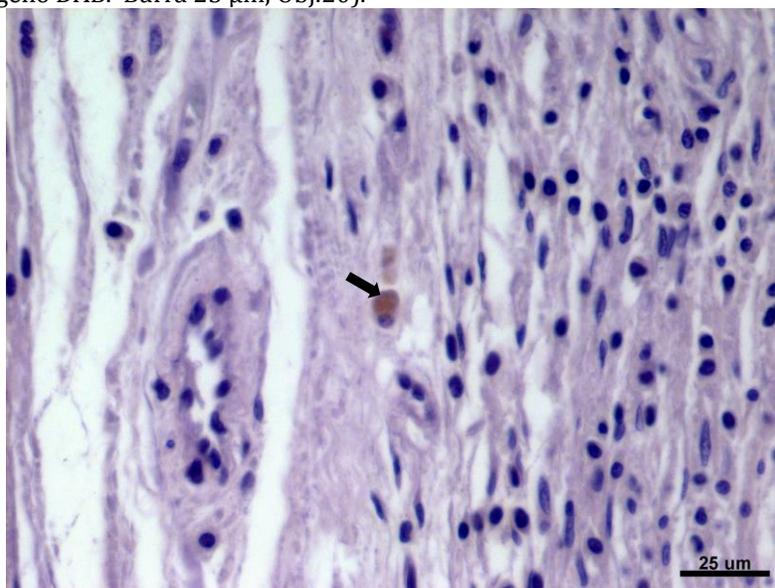


Figura 12: Neosporose em cabras. Placenta, Cabra 4. Imunomarcação INF-Y (seta) em porção coriônica. (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB. 25μm, Obj.40).

CONCLUSÕES GERAIS

Existem diferenças na produção de citocinas inflamatórias entre cabras positivas e negativas para *Neospora caninum* durante os cinco meses de gestação. Foram encontradas linfócitos T, T auxiliares, linfócitos B, NK, macrófagos, T $\gamma\delta$ e expressão de INF- γ e MHC-II na placenta de cabras negativas e naturalmente infectadas por *Neospora caninum*. Ocorreram diferenças estatísticas entre o número de células marcadas em cabras positivas e em negativas. Além disso, houve correlação positiva significativa entre os resultados de RIFI com linfócitos T (marcador CD3), macrófagos e T $\gamma\delta$. Houve correlação positiva entre T $\gamma\delta$ tanto com linfócitos T(marcador CD3) quanto com macrófagos. Adicionalmente, foi observada correlação positiva entre linfócitos T auxiliares (marcador CD4) e *Natural Killer* (marcador CD335). Este é o primeiro estudo a analisar o perfil de citocinas nos soro e células em placentas de cabras naturalmente infectadas por *N. caninum* ao final da gestação.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Ca.P.3037 - Lavras - MG - 37206-000 - (35) 3829-5182 cbae@nmlac.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 036/14, relativo ao projeto intitulado Caracterização de eventos imunopatológicos em placenta e soro de caprinos naturalmente infectados por *Neospora caninum* utilizando métodos imunohistoquímicos e ELISA, 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 15/10/2014.

Início do projeto: 15/10/2014 - Término do projeto: 01/08/2017.
Espécie: Caprino - Quantidade de animais: 8.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 036/14, related to the project entitled "Characterization of immunopathological events in placenta and serum of goats naturally infected with *Neospora caninum* using immunohistochemistry and ELISA methods", 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 October 15, 2014.

Project's beginning: 15/10/2014 - Project's end: 01/08/2017.
Species: Caprino - Number of animals: 8.

Lavras, 15 de outubro 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 37206-000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829-5182
cbae@nmlac.ufla.br - www.ufla.br

ANEXO B - CABRAS UTILIZADAS NO EXPERIMENTO

cabras	Titulação para <i>Neospora caninum</i>	Nome
1	1:3200	Paquita
2	1:3200	Amy
3	1:3200	Bruna
4	1:800	Fiona
5	1:800	Brisa
6	1:400	Joaquina
7	1:400	Akiko
8	Negativa	Catita
9	Negativa	Sem nome