



IVAM MOREIRA DE OLIVEIRA JUNIOR

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA ENDÓGENA DE
Neospora caninum EM SUCESSIVAS GERAÇÕES DE CABRAS
CONGENITAMENTE INFECTADAS**

**LAVRAS - MG
2018**

IVAM MOREIRA DE OLIVEIRA JUNIOR

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA ENDÓGENA DE
Neospora caninum EM SUCESSIVAS GERAÇÕES DE CABRAS
CONGENITAMENTE INFECTADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária para a obtenção do título de Mestre.

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

Dr. Djeison Lutier Raymundo
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2018**

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

Oliveira Junior, Ivam Moreira de.

Transmissão transplacentária endógena de *Neospora caninum*
em sucessivas gerações de cabras congenitamente infectadas : . /

Ivam Moreira de Oliveira Junior. - 2018.

46 p. : il.

Orientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Coorientador(a): Djeison Lutier Raymundo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Caprinos. 2. Neosporose. 3. Transmissão vertical. I.
Varaschin, Mary Suzan. II. Raymundo, Djeison Lutier. III. Título.

IVAM MOREIRA DE OLIVEIRA JUNIOR

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA ENDÓGENA DE *Neospora caninum* EM
SUCESSIVAS GERAÇÕES DE CABRAS CONGENITAMENTE INFECTADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de agosto de 2018

Dr. Djeison Lutier Raymundo

Dra. Ana Paula Peconick

Dra. Kiyoko Uemura Utiumi

UFLA

UFLA

UNILAVRAS

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

Dr. Djeison Lutier Raymundo
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2018**

Aos meus pais e familiares, por acreditarem em mim e por sempre estarem ao meu lado, por todo apoio, compreensão e, acima de tudo, amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas bênçãos derramadas em minha vida e por todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais, principalmente à minha mãe, Claudineia Rodrigues da Silva, por todo o esforço e dedicação para me ver chegar até aqui, ao meu pai Ivan Moreira de Oliveira e à minha irmã Jessika, por todo o apoio e conselhos durante todos esses anos. Aos meus avós, tios, tias e primos.

Aos amigos e colegas do Setor de Patologia Veterinária, pois dividimos juntos momentos de alegria e tristeza durante essa jornada.

À minha orientadora, Mary Suzan Varaschin, por toda paciência e apoio durante todos esses anos, desde a iniciação científica. Aos demais professores da Patologia, Angélica T. Barth Wouters, Flademir Wouters, Djeison Lutier Raymundo, por todo ensinamento, dedicação e exemplo.

Aos alunos de iniciação científica Lucas Mesquita e Letícia Penha e da graduação Fernanda, Luísa, Luan e Marcus, que cuidaram tão bem das cabras e auxiliaram diversas vezes, quando precisei.

Ao Rodrigues e ao Sr. Francisco, pela ajuda no laboratório e cuidado com as cabras.

À CAPES, pela bolsa de mestrado. À FAPEMIG, pelo apoio financeiro (CVZ-PPM 00763/16).

Enfim, sem vocês esse trabalho não seria possível.

MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário considerado importante agente de distúrbios reprodutivos em ruminantes de todo o mundo. Os canídeos são considerados hospedeiros definitivos e espalham oocistos no ambiente, os quais se tornam infectantes e servem como fonte de infecção, por via oral, para outras espécies, porém a transmissão vertical é considerada a principal forma de infecção e de manutenção de *N. caninum* nos rebanhos. Diversos estudos de soroprevalência, utilizando a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), foram realizados em ruminantes, porém ainda são escassos em bovinos e inexistentes em caprinos estudos que avaliam a transmissão de *N. caninum* entre sucessivas gerações. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar, por meio da RIFI, a cinética de anticorpos anti-*N. caninum* em até cinco gerações de cabras leiteiras naturalmente infectadas pelo parasito, a fim de saber se todos os animais nascem infectados ou se seria possível ao animal ficar livre da infecção com o passar das gerações. O soro para pesquisa de IgG anti-*N. caninum* foi obtido de sangue coletado no dia da parição e antes dos filhotes mamearem o colostro. Foram utilizadas seis famílias de cabras, sendo três famílias até a quinta geração, duas até a quarta geração e uma família até a terceira geração. Também foram avaliadas as taxas de transmissão congênita em mais de uma parição da mesma cabra. Como controle negativo foi utilizada uma família de caprinos até a quarta geração. Todas as cabras foram mantidas em baias à noite e em piquetes telados durante o dia, livres do contato com outros animais. Os resultados demonstraram que a infecção por *N. caninum* se manteve ao longo das gerações das famílias estudadas. O título de anticorpos anti-*N. caninum* nos descendentes foi flutuante (aumentando ou diminuindo) e não teve influência na transmissão congênita do parasito. Apesar de terem sido avaliadas somente uma a quatro gestações por cabra, o número de gestações não influenciou na taxa de transmissão congênita. Desta forma, sugere-se que a infecção se mantém ao longo da vida e em várias gerações dos caprinos.

Palavras-chave: Caprinos. Neosporose. Transmissão vertical.

ABSTRACT

Neospora caninum is an important etiological agent of reproductive disorders in ruminants around the world. Canids are the definitive hosts of the parasite and spread oocysts in the environment, that become infective and are the source of oral infection for other species, but the vertical transmission is the main source of *N. caninum* infection and its maintenance in livestock. Several seroprevalence studies using indirect fluorescent antibody test (IFAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were performed in ruminants, but are still scarce in cattle and non-existent in goat studies that evaluate the transmission of *N. caninum* in successive generations. Therefore, the aim of this study was to evaluate the kinetics of antibodies anti-*N. caninum* by IFAT in up to five generations of dairy goats naturally infected by the parasite in order to know if all the animals are born infected or if it would be possible to be free of the infection over the generations. Serum for screening anti-*N. caninum* IgG was obtained from blood collected on the goat parturition and of the goat kids before the colostrum ingestion. Six goat families were evaluated, three families up to the fifth generation, two up to the fourth generation and one family up to the third generation. Transmission rates in more than one gestation of the same goat were also evaluated. One family up to the fourth generation was used as negative control. All goats were housed overnight and maintained in an isolated fenced paddock over the day, without contact with other animals. The results demonstrated that the infection by *N. caninum* was maintained throughout the generations of the studied families. The anti-*N. caninum* antibodies titers in the offspring were fluctuating (rising or declining) and had no influence on the parasite congenital transmission. Although only one to four pregnancies per goat were evaluated, the number of pregnancies did not influence the rate of congenital transmission, so it is suggested that the infection is maintained throughout the life of the goat and in several generations.

Key words: Goats. Neosporosis. Vertical transmission.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Ciclo de vida de *Neospora caninum*.....17

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figura 1 - Árvore genealógica da família 1, demonstrando os títulos de IgG anti *N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s) dos caprinos e o resultado do PCR nos fetos.....32

Figura 2 - Árvore genealógica da família 2, demonstrando os títulos de IgG anti *N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s) e resultado da PCR nos fetos.....36

Figura 3 - Árvore genealógica da família 3, demonstrando os títulos de IgG anti *N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s) e resultado da PCR nos fetos.....37

Figura 4 - Árvore genealógica da família 4, demonstrando os títulos de IgG anti *N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s) e resultado da PCR nos fetos.....38

Figura 5 - Árvore genealógica da família 5, demonstrando os títulos de IgG anti *N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s).....39

Figura 6 - Árvore genealógica da família 6, demonstrando os títulos de IgG anti *N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s).....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das análises histopatológica e molecular dos fetos.....	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
M	Molar
min	Minutos
Mg	Miligrama
mM	Micromolar
Ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
TAN	Teste de aglutinação de <i>Neospora</i>
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

LISTA DE SIGLAS

PB	Paraíba
RN	Rio Grande do Norte

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i>	16
2.2 Transmissão congênita	17
2.3 – Diagnóstico	18
2.3.1 Sorológico	19
2.3.2 Anatomopatológico e imuno-histoquímico	20
2.3.3 Molecular	21
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
REFERÊNCIAS	23

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA ENDÓGENA DE <i>Neospora caninum</i> EM SUCESSIVAS GERAÇÕES DE CABRAS CONGENITAMENTE INFECTADAS.....	27
RESUMO.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS	30
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO 1.....	46

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário do Filo Apicomplexa, parasito intracelular obrigatório, que possui os canídeos como hospedeiros definitivos (DUBEY; SCHARES, 2011) e várias espécies animais como hospedeiros intermediários, entre elas os caprinos (DUBEY et al., 2017). A neosporose é considerada uma importante causa de aborto em bovinos leiteiros e de corte em todo o mundo (DUBEY; SCHARES, 2011) e em caprinos vem se destacando como importante agente de falhas reprodutivas (MESQUITA et al., 2013).

Apesar dos canídeos espalharem oocistos no ambiente e estes servirem como fonte de infecção, por via oral, para outras espécies, a transmissão vertical desse agente é considerada a principal fonte de infecção (ALMERIA et al., 2003) para bovinos (DUBEY et al., 2017; MACALDOWIE et al., 2004) e caprinos (COSTA et al., 2014; MESQUITA et al., 2013; VARASCHIN et al., 2012).

A neosporose clínica em ruminantes se manifesta por abortos recorrentes e falhas reprodutivas, com repetição deaios. Os abortos podem ocorrer em qualquer época da gestação, sendo em bovinos mais frequentes no 5º e no 6º mês de gestação. Também podem ocorrer absorção embrionária, mumificação fetal, maceração fetal, natimortalidade, nascimento de animais vivos com sinais clínicos ou nascimento de animais clinicamente normais, mas permanentemente infectados (DUBEY; SCHARES, 2011). Já, em caprinos, há poucos relatos de abortos ou falhas reprodutivas (MESQUITA et al., 2013; VARASCHIN et al., 2012) e nascimento de animais não infectados (MESQUITA et al., 2013).

O aborto ocorre após transmissão transplacentária, que pode ser exógena ou endógena. A primeira é decorrente da ingestão de oocistos liberados nas fezes de cães, já a segunda é devida a recrudesência de bradizoítos encistados, que se transformam na forma infectante denominada taquizoíto (DUBEY; SCHARES, 2011; ROSBOTTOM et al., 2008), porém a grande maioria dos animais, tanto bovinos quanto caprinos, nasce clinicamente sadia (MACALDOWIE et al., 2004; MESQUITA et al., 2013). Após a transmissão não se sabem ao certo os mecanismos específicos causadores do aborto. Possivelmente, fatores como tempo da primeira infecção, tempo de recrudesência do parasito (DUBEY; SCHARES, 2011; ROSBOTTOM et al., 2008) em animais persistentemente infectados, imunomodulação

da resposta imunológica materna para o tipo Th1, cepa parasitária, suscetibilidade do hospedeiro e estágio de desenvolvimento fetal em que a infecção foi adquirida podem influenciar na ocorrência ou não do aborto (DUBEY et al., 2017).

Estudos de transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos tiveram como principal objetivo determinar a taxa de transmissão congênita e/ou via de transmissão dentro de um determinado rebanho ou família, usando técnicas sorológicas como RIFI e ELISA (BERGERON et al., 2000; BJÖRKMAN et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2014). Além disso, estudos em bovinos apontam que o índice de transmissão congênita diminui com o aumento do número de partições ou pela idade da mãe (DIJKSTRA et al., 2003; HERNANDEZ et al., 2002) provavelmente, por aumento na imunidade protetora contra *N. caninum*. Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa em uma geração de cabras, animais que tiveram título de anticorpos anti-*Neospora caninum* de 1:400 na RIFI, pariram animais não infectados (MESQUITA et al., 2013). Algumas questões em relação à patogenia da neosporose ainda não foram elucidadas. Ainda há dúvidas se durante a passagem do parasito entre gerações, esses animais poderiam diminuir a carga parasitária ou mesmo ficar livres da infecção, por possível resposta imunológica ao agente. Desta forma, este estudo teve por objetivo estudar a cinética de anticorpos anti-*N. caninum* em três a cinco gerações de seis famílias de cabras leiteiras naturalmente infectadas e avaliar as taxas de transmissão em mais de uma partição/cabra.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ciclo de vida de *Neospora caninum*

Neospora caninum foi descrito pela primeira vez como um esporozoário associado a casos de encefalomielite e miosite em cães (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Posteriormente, foi isolado e classificado como um novo gênero – *Neospora* e uma nova espécie, *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988).

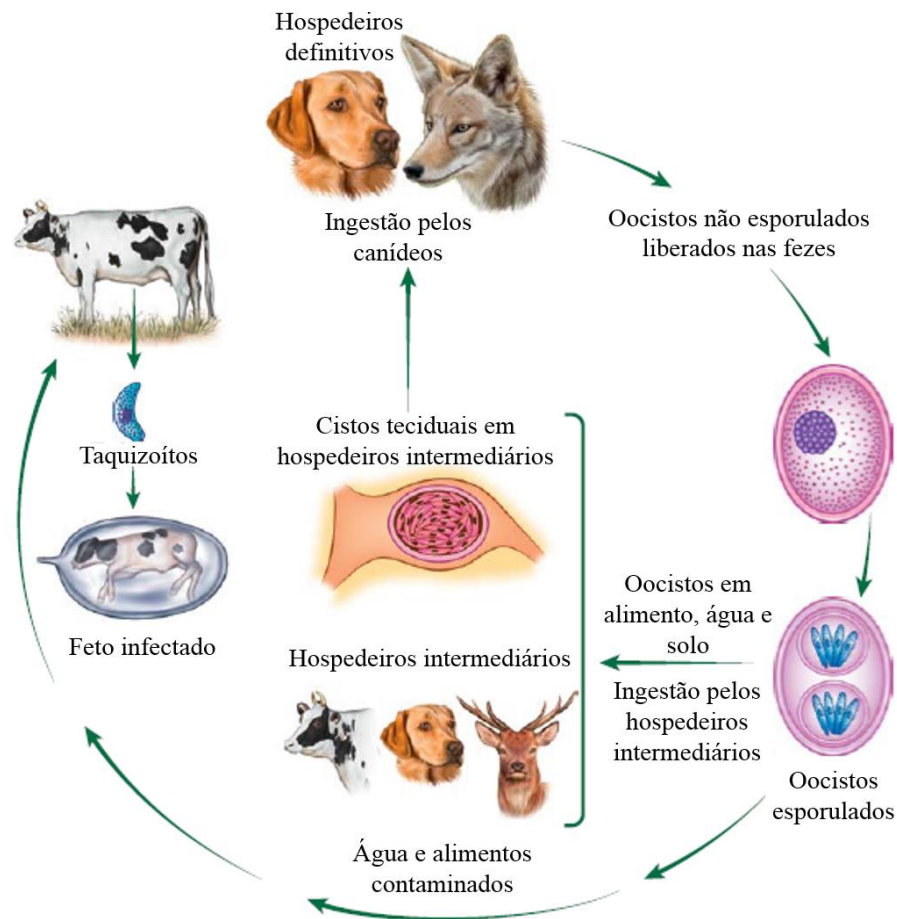
N. caninum é um protozoário do Filo Apicomplexa, que pertence à família Sarcocystidae (DUBEY et al., 1988). As espécies pertencentes à família Sarcocystidae se caracterizam por ciclo biológico heteroxeno, sendo o cão (*Canis lupus familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY; SCHARES, 2011) descritos como hospedeiros definitivos (HD) e várias espécies animais, entre elas os caprinos, como hospedeiros intermediários (HI) (MCALLISTER et al., 1998).

O ciclo de vida de *N. caninum* (Figura 1) se divide em três estágios infectantes: oocistos, taquizoítos e bradizoítos (DUBEY et al., 2017). Após a ingestão de tecidos ou órgãos dos HI, como membranas placentárias de animais contendo cistos teciduais, os HD eliminam oocistos não esporulados nas fezes. Esses oocistos medem 10-12µm e a esporulação ocorre em torno de 24 horas após a sua eliminação no ambiente (DIJKSTRA et al., 2003; DUBEY et al., 2017; LINDSAY et al., 1995).

Os HI infectam-se pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos esporulados (DUBEY et al., 2017), resultando na liberação dos esporozoítos, que se transformam em taquizoítos (estágio de multiplicação rápida) e, posteriormente, em cistos teciduais contendo bradizoítos. Os taquizoítos são ovoides, lunares ou globulares e medem, dependendo do estágio de divisão, de 2 a 6-7,5µm, e dividem-se em dois zoítos por endodiogenia. Em animais infectados, os taquizoítos podem ser encontrados em diversas células, tais como células do sistema nervoso central, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células tubulares renais e hepatócitos (DUBEY et al., 2017). Já os cistos de *N. caninum* são arredondados a ovalados, revestidos por parede espessa que pode

chegar a 4 μ m, e são preenchidos por bradizoítos alongados de aproximadamente 8 x 2 μ m e com um núcleo subterminal (DUBEY et al., 2017).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Neospora caninum*



Fonte: Adaptado de Dubey et al. (2017).

2.2 Transmissão congênita

A neosporose é considerada uma das principais causas de falhas reprodutivas em ruminantes (DUBEY et al., 2017; MESQUITA et al., 2013, 2018), sendo a transmissão congênita a principal forma de manutenção do agente nos rebanhos (DUBEY, 2017).

A transmissão congênita pode ocorrer quando os taquizoítos de um animal infectado passam para o feto durante a gestação (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Björkman et al. (1996), utilizando provas sorológicas de ELISA e RIFI, realizaram um estudo com duas famílias de bovinos provenientes de um rebanho com índice de 7% de problemas reprodutivos, como natimortalidade, abortos, mumificação fetal e mortes dos bezerros com idade inferior a um mês, e observaram que todas as vacas testadas e consideradas soronegativas para *N. caninum* tiveram filhos soronegativos, enquanto duas vacas soropositivas pariram bezerros soropositivos. Uma das vacas soropositivas teve dois filhos, um soronegativo e um soropositivo, indicando que animais soropositivos podem gerar descendentes soronegativos.

Schares et al. (1998) determinaram a transmissão em diferentes famílias de bovinos, testando os animais por grupos, pelas técnicas de ELISA e RIFI, com 93% dos descendentes soropositivos. Nesse mesmo estudo fez-se a árvore genealógica das famílias e, em uma família, constatou-se que um ramo apresentou cinco descendentes soropositivos e um segundo ramo oito animais soronegativos, sugerindo que *N. caninum* pode ser mantido no rebanho por várias gerações, com prevalência quase que constante. Já em caprinos determinou-se uma taxa de infecção transplacentária em uma única geração de 77% (MESQUITA et al., 2013).

Magalhães et al. (2014), utilizando a RIFI para titulação de anticorpos anti-*N. caninum*, construíram e analisaram 63 árvores genealógicas de duas a quatro gerações por família de bovinos. Os autores observaram que em 29 famílias (46%) havia bovinos soropositivos para *N. caninum*. Em cinco dessas famílias, todos os animais eram soropositivos, enquanto em 16 famílias 25% a 90% dos membros eram soropositivos. Nesse estudo não foram comparadas as titulações entre mãe e filho, bem como não foi avaliado se houve diminuição ou aumento da titulação, informando somente que, em algum momento, descendentes de mães soropositivas foram negativos para *N. caninum*. Concluíram que não ocorreram diferenças entre a soropositividade da progênie em relação ao número de partos, diferindo de autores que demonstraram que as taxas de transmissão podem diminuir com o aumento do número de gestações (DIJKSTRA et al., 2003; LOPEZ-GATIUS et al., 2004a).

2.3 Resposta imunológica na gestação

A resposta imunológica da mãe contra a infecção por *N. caninum* (BARTLEY et al., 2013) não foi completamente elucidada. Entretanto, há evidências que *N. caninum* possui uma

variedade de antígenos, os quais modulam a resposta imune protetora para o hospedeiro, enquanto outros possuem o efeito oposto, favorecendo a multiplicação do parasito e causando danos ao hospedeiro (HEMPHILL et al., 2013).

Em um estudo realizado por Macaldowie et al. (2004) com bovinos experimentalmente infectados foi demonstrado que as consequências da infecção para o feto são mais graves no início da gestação do que no terço final de gestação, pois no terço inicial de gestação o sistema imunológico do feto não está suficientemente desenvolvido para o controle da infecção parasitária (DUBEY; BUXTON; WOUUDA, 2006). Entretanto, no terceiro trimestre de gestação o feto já é capaz de montar uma resposta imunológica para controlar a proliferação desse parasito (INNES et al., 2005).

2.4 Diagnóstico

2.4.1 Sorológico

Testes sorológicos, como a RIFI, teste de aglutinação de *Neospora* (TAN) e diferentes ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) foram desenvolvidos para diagnóstico da neosporose em várias espécies animais, sendo realizados principalmente em caninos, bovinos (DUBEY et al., 2017) e caprinos (MESQUITA et al., 2013). Dentre esses testes, a RIFI é considerada padrão ouro, quando comparada aos outros (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999). Na RIFI são utilizados taquizoítos íntegros que apresentam antígenos de superfície, detectados pelos anticorpos. Os antígenos de membrana são considerados mais específicos que os componentes intracelulares em espécies do filo Apicomplexa (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

Estudos de soroprevalência em caprinos têm sido realizados em várias regiões do Brasil. A frequência encontrada em rebanhos de Minas Gerais foi de 10,7%, utilizando-se a diluição inicial de 1:50 como ponto de corte ($RIFI \geq 1:50$) (ANDRADE et al., 2013; VARASCHIN et al., 2012), sendo esta maior que os relatados por outros autores que utilizaram a mesma metodologia para *N. caninum*, como 1,05% em Mossoró, RN (LIMA et al., 2008), 3,3% em Patos, PB (FARIA et al. 2007), 4,59% no estado de Santa Catarina (TOPAZIO et al., 2014) e 6,34% e São Paulo (FIGLIUOLO et al., 2004). No estado da

Bahia, valores maiores foram obtidos, onde 15% das cabras testadas foram reagentes ($RIFI \geq 1:100$) a *N. caninum* (UZEDA et al., 2007). Por outro lado, Moraes et al. (2011) avaliaram a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* no oeste do Maranhão e encontraram soroprevalência de 10% ($RIFI \geq 1:25$).

Nos ruminantes, a infecção intra-uterina é a principal forma de transmissão de *N. caninum*. A transmissão congênita é de extrema importância na neosporose, uma vez que, em rebanhos bovinos infectados, 81% a 95% das vacas soropositivas podem transmitir a infecção para as suas crias (WOUDA et al., 2007). Pesquisas indicam que vacas soropositivas possuem duas a 26 vezes mais chances de abortar em relação às soronegativas (LOPEZ-GATIUS et al., 2004b; WESTON et al., 2005). Há um aumento no título de anticorpos quatro a cinco meses antes do parto, sugerindo que ocorre reativação de infecções latentes. Pouco se conhece sobre esse mecanismo de reativação, embora ocorra parasitemia durante a gestação, levando a infecção fetal (DUBEY, 2003). Em caprinos, 83,3% dos animais tiveram aumento significativo nos valores de IgG anti-*N. caninum* a partir da segunda metade gestacional (MESQUITA et al., 2013).

2.4.2 Anatomopatológico e imuno-histoquímico

Lesões macroscópicas associadas à neosporose são raras, sendo descritos em cabras somente hidrocefalia com hipoplasia de cerebelo (DUBEY et al., 1996) e um quadro de porencefalia, caracterizada por ausência de substância branca cerebral, com resultante 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*. Os órgãos de eleição para o diagnóstico histopatológico são cérebro, coração (DUBEY et al., 2006, NAKAGAKI et al., 2016), músculo esquelético (PESCADOR et al., 2007; NAKAGAKI et al., 2016) e pulmão; estes dois últimos principalmente nos casos de autólise do encéfalo (PESCADOR et al., 2007). Nesses órgãos são observados infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, associados ou não a cistos ou taquizoítos de *N. caninum* (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; COSTA et al., 2014; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014; MESQUITA et al., 2018; NAKAGAKI et al., 2016).

No sistema nervoso central, além de meningoencefalite não supurativa também podem ser encontradas áreas de necrose e gliose (VARASCHIN et al., 2012, COSTA et al., 2014). Placentite necrótica multifocal também tem sido observada em infecções experimentais em bovinos (CASPE et al., 2012), caprinos (PORTO et al., 2016) e em ovinos experimentalmente (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015) e naturalmente infectados (AZEVEDO FILHO et al., 2017). Em cabras naturalmente infectadas é descrita necrose multifocal acentuada, algumas vezes focalmente extensa nos cotilédones placentários, principalmente nas vilosidades coriônicas, envolvendo as células trofoblásticas e o mesênquima. Infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raros neutrófilos foi observado no interstício abaixo do epitélio coriônico, associado ou não a estruturas parasitárias (MESQUITA et al., 2018).

O diagnóstico da neosporose pode ser confirmado pela realização de imunohistoquímica (IHQ) em tecidos fixados em formol, tendo como vantagem a possibilidade da realização de estudos retrospectivos. Podem ser utilizados anticorpos monoclonais ou policlonais, porém, pela IHQ, grupos de taquizoítos frequentemente não podem ser distinguidos de cistos teciduais, a não ser que seja utilizado um anticorpo específico para a marcação de bradizoítos, como por exemplo, o anticorpo anti-BAG1 (do inglês *bradyzoite antigen 1*) (DUBEY et al., 2017). Vários trabalhos descrevem estruturas parasitárias, principalmente cistos, no encéfalo de fetos, cabritos recém-nascidos ou cabritos jovens (CORBELLINI et al., 2001; COSTA et al., 2014, VARASCHIN et al., 2012), porém a IHQ é menos sensível do que a PCR na detecção de infecção por *N. caninum*, principalmente em animais adultos (NAKAGAKI et al., 2016). Segundo Dubey et al., 2017, quantidades maiores que 10.000 organismos por grama de tecido são necessárias para que *N. caninum* possa ser visualizado em cortes histológicos (DUBEY et al., 2017).

2.4.3 Molecular

As técnicas moleculares frequentemente utilizadas no diagnóstico da neosporose em caprinos são a PCR simples (ELENI et al., 2004; COSTA et al., 2014; NAKAGAKI et al., 2016), Nested PCR (MASALA et al., 2007; MORENO et al., 2012) e o sequenciamento de material genômico (NAKAGAKI et al., 2016). A detecção de DNA de *N. caninum* por PCR representa um dos métodos mais eficientes para o diagnóstico da infecção em tecidos de fetos

abortados, animais recém-nascidos ou com neosporose clínica, sendo a placenta e o encéfalo os tecidos mais indicados para detecção do DNA de *N. caninum* (DUBEY et al., 2017).

As regiões gênicas codificadoras de RNA ribossomal mais utilizadas para a confecção de *primers* e identificação de *N. caninum* são a ITS1 (PAYNE; ELLIS, 1996; MASALA et al., 2007; MORENO et al., 2012; MESQUITA et al., 2018), região 18S (ELENI et al., 2004), a NC-5 (YAMAGE; FLECHTNER; GOTTSTEIN, 1996). Também foram utilizados *primers* baseados no cromossomo XII de *N. caninum* (ORLANDO et al., 2013; COSTA et al., 2014; NAKAGAKI et al., 2016).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados, dos 95 soros submetidos à RIFI, 93 apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* (97,89%). Distúrbios reprodutivos como abortos, natimortos ou retenção fetal ocorreram a partir de títulos de anticorpo anti-*N. caninum* de 1:400. Ao todo, ocorreram 48 partos e cinco distúrbios reprodutivos, o que equivale à taxa de 10,42%.

Os resultados demonstram que a infecção por *N. caninum* se mantém ao longo das gerações, que os títulos de anticorpos anti-*N. caninum* nos descendentes podem ser flutuantes (aumentando ou diminuindo) e não influenciam na transmissão congênita do parasito, assim como o número de gestações não diminuiu a taxa de transmissão congênita. Este estudo é o primeiro sobre cinética de anticorpo e taxa de transmissão vertical em várias gerações de cabras contribuindo, com isso, para o entendimento da patogenia de *N. caninum* em caprinos.

REFERÊNCIAS

- ALMERIA, S. et al. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, v. 25, p. 383-392, 2003.
- ANDRADE, G.S. et al. Seroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais state, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 584-586. 2013.
- ARRANZ-SOLÍS, D. et al. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. **Veterinary Research**, v. 46, n. 19, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346111/#>> Acesso 14 out. 2018.
- AZEVEDO FILHO, P. C. G. et al. Incidence and vertical transmission rate of *Neospora caninum* in sheep. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 52, p. 19-22, 2017.
- 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. 91, p. 2-14, 2013.
- BERGERON, N. et al. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, p. 464-467, 2000.
- BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-274, 1984.
- BJÖRKMAN, C. et al. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 9, p. 1441-1444, 1996.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.
- CASPE, S. G. et al. The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2-4, p. 171-181, 2012.
- 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**, v. 13, p. 416-419, 2001.
- COSTA, R. C. et al. Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 291-, 2014.
- DIJKSTRA, T. H. et al. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 100, p. 161-169, 2003.
- DUBEY, J. P. et al. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1269- 1283, 1988.
- DUBEY, J. P. Antibody responses measured by various serologic tests in pigs orally

inoculated with low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 1733–1737, 1996.

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

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

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

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

DUBEY, J. P.; HEMPHILL, A.; SCHARES, G.; CALERO-BERNAL, R. (Eds). **Neosporosis in animals**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2017. p. 329-336.

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

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

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

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

GONZÁLEZ-WARLETA et al. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. **Veterinary Research**, v. 45, n. 88, 2014. Disponível em: <<https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-014-0088-5>> Acesso em: 15/10/2018.

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, 2013.

HERNANDEZ, J., RISCO, C., DONOVAN, A. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 12, p. 1742-1746, 2002.

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

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

LIMA, J. T. R. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Braz J Vet**

Res Anim Sci, v. 45, n. 2, p. 81-86, 2008.

LINDSAY, D. S. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pigmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **Am J Vet Res**, v. 56, p. 1176-1180, 1995.

LOPEZ-GATIUS, F.; PABÓN, M.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 606-613, 2004a.

LOPEZ-GATIUS, F. et al. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in northeast Spain. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, p. 348–352, 2004b.

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**, v. 131, p. 142-156, 2004.

MAGALHÃES, V. C. S. et al. Transmission paths of *Neospora caninum* in a dairy herd of crossbred cattle in the northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 257-264, 2014.

MASALA, G. et al. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 96-98. 2007.

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

MESQUITA, L. P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 327- 333, 2013.

MESQUITA, L. P. et al. Placental lesions associated with abortion and stillbirth in goats naturally infected by *Neospora caninum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.3, p.444-449, 2018.

MORAES, L. M. B. et al. Ocorrência de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos e ovinos do oeste do Maranhão, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.20, n. 4, p. 312-317, 2011.

MORENO, B. et al., Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 312. 2012.

NAKAGAKI, K. Y. R.. Lesions and distribution of *Neospora caninum* in tissues of naturally infected female goats. **Small Ruminant Research**, v. 140, p. 57-62, 2016.

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

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

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

PORTO, W. J. N. et al. Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage

on the outcome of infection. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1. p. 29, 2016.

ROSBOTTOM, A. et al. 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**, v. 76, p. 2352-2361, 2008.

SCHARES, G. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 87-98, 1998.

UZEDA, R. S. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 70, p. 257-259, 2007.

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

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

WESTON, J. F. et al. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, p. 142-148, 2005.

WOUDA, W.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 545-547, 2007.

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

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA ENDÓGENA DE *Neospora caninum* EM
SUCESSIVAS GERAÇÕES DE CABRAS CONGENITAMENTE INFECTADAS**

(VERSÃO PRELIMINAR)

Escrito nas normas da Revista Veterinary Parasitology

Qualis: A2

Fator de impacto (JCR): 2.356

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário considerado importante agente de distúrbios reprodutivos em ruminantes de todo o mundo, sendo a transmissão vertical a principal forma de infecção e manutenção da neosporose em rebanhos. Em caprinos não há estudos que avaliem a transmissão de *N. caninum* entre sucessivas gerações. Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar, por meio da RIFI e da PCR, a transmissão transplacentária endógena de *N. caninum* em até cinco gerações de seis famílias de cabras leiteiras naturalmente infectadas pelo parasito e se seria possível ao animal ficar livre da infecção com o passar das gerações. Dos 95 soros analisados, 93 apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* (97,89%). Os títulos de anticorpos anti-*N. caninum* nos descendentes foram flutuantes (aumentando ou diminuindo) e não influenciaram na transmissão congênita do parasito. Distúrbios reprodutivos, como abortos, natimortos ou retenção fetal ocorreram em animais a partir de títulos de anticorpo anti-*N. caninum* de 1:400, com uma taxa de 10,42%. Os resultados demonstraram que a infecção por *N. caninum* se mantém ao longo das gerações e que o número de gestações não diminuiu a taxa de transmissão congênita em caprinos.

Palavras-chave: Neosporose, RIFI, PCR.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, parasito intracelular obrigatório, que possui os cães domésticos e canídeos selvagens como hospedeiros definitivos (DUBEY; SCHARES, 2011) e várias espécies como hospedeiros intermediários, entre elas os caprinos (DUBEY et al., 2017). A neosporose é considerada uma importante causa de aborto em bovinos em todo o mundo (DUBEY; SCHARES, 2011), podendo ocorrer também absorção embrionária, mumificação fetal, maceração fetal, natimortalidade, nascimento de animais com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas permanentemente infectados (DUBEY; SCHARES, 2011). Em caprinos *N. caninum* vem se destacando como importante agente causador de falhas reprodutivas (MESQUITA et al., 2013, MESQUITA et al., 2018).

Os canídeos espalham oocistos infectantes no ambiente e estes são fonte de infecção, por via oral, para outras espécies. Entretanto, a transmissão vertical desse agente é considerada a principal fonte de infecção (ALMERIA et al., 2003) para bovinos (MACALDOWIE et al., 2004; DUBEY et al., 2017) e caprinos (VARASCHIN et al., 2012; MESQUITA et al., 2013; COSTA et al., 2014).

Na neosporose algumas questões em relação à patogenia ainda não foram elucidadas. Ainda há dúvidas se durante a passagem do parasito entre gerações esses animais poderiam diminuir o nível de parasitismo ou mesmo ficar livres da infecção, por possível resposta imunológica ao agente. Estudos de transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos tiveram como principal objetivo determinar a taxa de transmissão congênita e/ou via de transmissão em determinado rebanho ou família usando técnicas sorológicas, como reação de imunofluorescência indireta (RIFI) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (BERGERON et al., 2000; BJÖRKMAN et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2014). Além disso, estudos em bovinos apontam maior risco de aborto em novilhas (THURMOND e HIETALA, 1999) e que a proporção de transmissão congênita diminui com o aumento do número de parições ou pela idade da mãe (HERNANDEZ et al., 2002; DIJKSTRA et al., 2003), provavelmente por aumento na imunidade protetora contra a transmissão transplacentária do parasito. Já outros autores apontam que o aumento no número de gestações está associado a um aumento no número de abortos (MAZUZ et al., 2014;

WOUDA et al., 1999). Em estudo realizado em uma geração de cabras e em somente uma parição, animais que tiveram titulação de anticorpos anti-*Neospora caninum* de 1:400 na RIFI pariram animais não infectados (MESQUITA et al., 2013). Não há trabalhos em caprinos definindo como se comporta o perfil sorológico de anticorpos anti-*N. caninum* em sucessivas gerações e gestações de uma mesma cabra infectada. Este estudo tem por objetivo determinar a transmissão transplacentária endógena de *N. caninum* em até cinco gerações de seis famílias de cabras, avaliar as taxas de transmissão em mais de uma parição de um mesmo animal e, desta forma, determinar se a infecção ocorre em todas as parições ou se seria possível esses caprinos ficarem livres da infecção com o passar das gerações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA (protocolo CEUA-UFLA 017/18).

Caprinos

Neste estudo confeccionou-se a árvore genealógica de seis famílias de caprinos da raça Saanen e mestiças, provenientes de um rebanho naturalmente infectado por *N. caninum* pertencente ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras. Destas famílias, três foram avaliadas até a quinta geração, duas até a quarta geração e uma até a terceira geração, totalizando 72 caprinos. Na representação gráfica das famílias (Figuras 1-6) cada gestação e, conseqüentemente, o(s) produto(s) desta, são apresentados em diferentes cores, escolhidas aleatoriamente. Como controle negativo foi utilizada uma família de cabras não infectadas por *N. caninum* até a quarta geração. Estas famílias foram constituídas de 2010 a 2017.

Todas as cabras foram mantidas em um piquete telado durante o dia e em baias de alvenaria durante a noite, sem introdução de novos animais no rebanho ou contato com possíveis hospedeiros definitivos de *N. caninum*. Neste ambiente receberam alimentação (feno/silagem e ração) duas vezes ao dia e água *ad libitum*. A gestação foi diagnosticada por ultrassonografia transabdominal no dia 30 após a monta e esse exame foi periodicamente

realizado para monitorar a viabilidade fetal. Todos os caprinos foram sorologicamente negativos para *Toxoplasma gondii* e *Brucella* sp. e negativos na reação em cadeia de polimerase (PCR) para *Coxiella burnetti* e *Chlamydia* sp.

Coleta das amostras para RIFI e PCR

Amostras de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* no soro foram coletadas dos caprinos ao nascimento, antes de mamarem o colostro e, para as fêmeas, novas coletas foram realizadas quando adultas, no dia do parto. Algumas cabras foram testadas em mais de uma gestação, totalizando, desta forma, 96 amostras de soro. Em duas cabras (Márcia e Nice) não foi possível a coleta de sangue antes de mamarem o colostro, desta forma, a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* no soro foi realizada somente aos três meses de idade, quando os anticorpos colostrais já estariam reduzidos ou ausentes (MESQUITA et al., 2013). Após a coleta os soros foram armazenados congelados a -20°C até a realização da RIFI.

Nos fetos em que não foi possível a realização da sorologia, amostras de telencéfalo foram coletadas e congeladas a -20°C para posterior análise molecular. Três cabras, selecionadas ao acaso, foram eutanasiadas no dia do parto e a transmissão para seus fetos foi confirmada por PCR e histopatologia, sendo uma cabra da família 1 (Brisa, quarta geração), uma da família 2 (Paquita, terceira geração) e uma da família 3 (Akiko, terceira geração).

Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

Os soros dos animais (filha/filho, mãe, avó, bisavó e tetravó) foram submetidos à RIFI para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum*. A RIFI foi realizada no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (DMV/UFLA) em soro armazenado em criotubos a -20°C. Como antígeno foram utilizados taquizoítos de *N. caninum* (amostra “NC-Beef”), mantidos em cultura.

Os soros foram descongelados em temperatura ambiente e foi utilizada diluição inicial 1:50 como ponto de corte (LINDSAY et al., 1995; MESQUITA et al., 2013) e, a partir dessa, foram diluídos em série dois (*twofold*). As amostras de soro foram diluídas em solução PBS (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2 e 10µl de cada soro teste foram colocados em cada

pocinho da lâmina, a qual foi incubada a 37°C por 45 minutos, em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS por duas vezes, mais duas vezes em água destilada e secas em temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas aplicou-se anticorpo anti-IgG caprino conjugado a fluoresceína (Sigma Chemical), diluído a 1:100 em PBS. As lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram submetidas ao mesmo processo de lavagem, secas e cobertas com glicerina tamponada 10% e examinadas em microscópio de luz ultravioleta. Em cada lâmina foram colocados os soros controles positivo e negativo. O título de anticorpos foi obtido pela maior diluição que resultou na completa fluorescência periférica dos taquizoítos de *N. caninum* (FIGLIUOLO et al., 2004). As amostras com fluorescência apical ou parcial foram consideradas negativas.

Análise Histopatológica

Os tecidos dos fetos, entre eles sistema nervoso central, coração e musculatura esquelética, foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. foram cortados a 3-4 µm e corados por hematoxilina e eosina. A pesquisa de lesões foi realizada em microscópio óptico.

Análise molecular

A extração do DNA celular do telencéfalo dos fetos foi realizada pela técnica de lise por proteinase K utilizando o kit Wizard SV *Genomic Purification System*, Promega, Madison, USA, segundo as recomendações do fabricante. As concentrações (ng/µl) e a qualidade do DNA extraído foram determinadas em espectrofotômetro *NanoVue™ plus* e eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Foram sintetizados iniciadores (Sigma-Aldrich) para a amplificação de sequências genéticas de *N. caninum* e utilizado o cromossomo XII como molde, dando origem aos *primers forwards* CTGTTAGAAGGTGCGGCGAA e *reverse* TCTCTTGCTGCGGTGGAAAT, que amplificam um fragmento de 168pb (pares de base) (ORLANDO et al., 2013). Cada PCR constituiu-se de 4X de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 75 mM de MgCl₂; 5 mM de dNTPs (Promega, Madison, USA); 50 ng da amostra de DNA; 1,6 U da Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega), 5 mM dos iniciadores *forward* e *reverse*; água deionizada autoclavada para completar um volume final de 25µl. Como controle branco, o DNA *template* foi substituído por água ultrapura *Milli-Q* e,

como controle positivo, foi utilizada amostra do encéfalo de um caprino naturalmente infectado por *N. caninum* (COSTA et al., 2014).

As reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) conforme o seguinte protocolo: desnaturação a 95°C por 5min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, anelamento de 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 7 min. As amostras foram aplicadas em gel de agarose de alta resolução 1,2%, coradas com Gel Red™ 1X, na voltagem de 100 volts em cuba de eletroforese horizontal, contendo TBE (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M) 45 como tampão de corrida. Com o auxílio de padrão de peso molecular (Ladder da Ludwig® 100pb, 250 microlitros) as bandas foram identificadas.

Análise Estatística

A soroprevalência nas famílias e no rebanho foi calculada pelo número de cabras positivas dividido pelo número total de animais testados. A taxa de distúrbios reprodutivos, como abortos, natimortos e retenção fetal foi calculada pelo número de ocorrência dividido pelo número de partições. A média de transmissão vertical por família foi realizada pela proporção de filhos soropositivos e PCR positiva, nascidos de mães soropositivas.

RESULTADOS

Todas as famílias tiveram caprinos soropositivos, com flutuação do título de anticorpos anti-*N. caninum* nos descendentes, por vezes aumentando ou diminuindo, porém sem influência na transmissão congênita do parasito (Figuras 1 a 6). Por exemplo, na família 5, com quatro gerações, a mãe apresentou título de 1:400 no primeiro e no segundo parto, sendo que na primeira gestação ela pariu animais negativos que se mantiveram negativos até a idade adulta, porém na segunda gestação pariu um macho e uma fêmea soropositivos e as fêmeas da segunda geração originaram fêmeas soropositivas na terceira e na quarta geração. Já a família 6 apresentou títulos altos na segunda e na terceira geração, seguidos da diminuição nos títulos na quarta e na quinta geração de um dos ramos da família. Das 95 amostras de soro submetidas a RIFI, 93 (97,89%) apresentaram anticorpos anti-*N. caninum*. Distúrbios reprodutivos, como abortos, natimortos ou retenção fetal, ocorreram a partir de

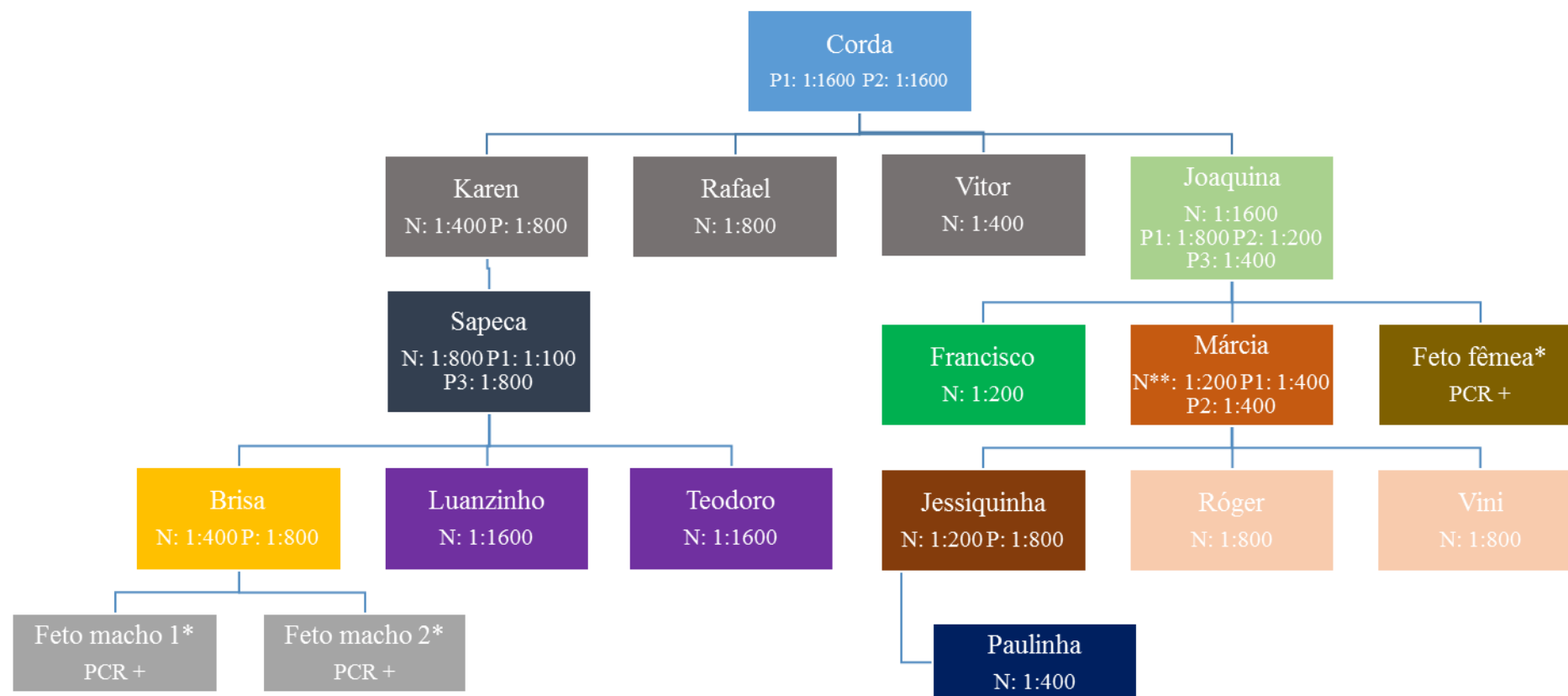
títulos de anticorpos anti-*N. caninum* de 1:400 (Figuras 1 a 6). Dos 48 partos, em cinco ocorreram distúrbios reprodutivos, o que equivale à taxa de 10,42%. Os problemas reprodutivos ocorreram na família dois, com oito partos, sendo que na primeira gestação (da primeira geração) ocorreu um aborto de 4 fetos e na terceira geração um natimorto, totalizando 25%. Na família 3, seis partos e um aborto (16,67%) e na família 4, de 11 partos ocorreram 2 (18, 18%) distúrbios reprodutivos (aborto e natimorto).

A taxa de transmissão vertical nas famílias variou de 71,43% a 100%. Esta foi calculada pela pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI no soro pré-colostral, e pela presença de DNA do parasito nos tecidos de fetos/natimortos por PCR. Quatro famílias (1, 2, 3 e 6) tiveram 100 % das amostras positivas para *N. caninum*. Na família 1 (Figura 1) foram testados 18 animais, sendo 26 soros e três amostras de tecido; na família 2 (Figura 2) 15 animais, sendo 16 amostras de soro e seis de tecidos; na família 3 (Figura 3) oito animais, sendo 10 amostras de soro e três de tecidos; e na família 6 (Figura 6), com oito animais, foram testadas 12 amostras de soro.

Na família 4 (Figura 4) foram testados 16 animais, sendo 23 amostras de soro submetidas a RIFI e cinco amostras de tecidos submetidas a PCR. Na segunda geração houve 100% de transmissão transplacentária. Já na terceira geração houve 85,71% de transmissão. Na quarta geração todas as amostras foram positivas, totalizando 100% de taxa de transmissão transplacentária. Na família 5 (Figura 5) foram testados sete animais, sendo 10 amostras de soro. Duas amostras, de dois animais da segunda geração (Bezerra e Junior) apresentaram titulação menor que 1:50, os demais animais foram soropositivos, totalizando 71,43% de taxa de transmissão transplacentária. Estes resultados demonstraram a flutuação dos títulos de anticorpos anti- *N. caninum*. A família utilizada como controle negativo se manteve soronegativa até a quarta geração (última geração) e não apresentou distúrbios reprodutivos.

As lesões microscópicas dos fetos estão descritas na Tabela 1.

Figura 1 - Árvore genealógica da família 1, demonstrando os títulos de IgG anti-*N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s) e resultado da PCR nos fetos



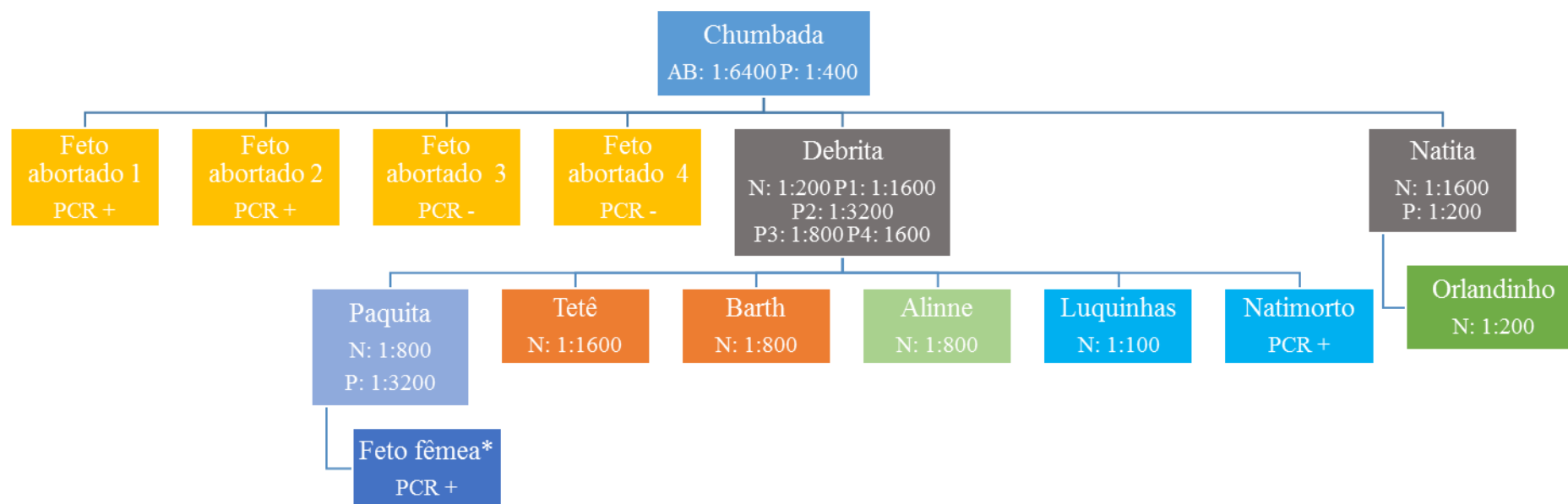
* Feto de mãe eutanasiada na última semana de gestação. Diagnóstico por PCR.

** Título de IgG anti-*N. caninum* três meses após o nascimento.

N: Título de IgG anti-*N. caninum* ao nascimento. P1: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 1. P2: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 2. P3: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 3.

OBS: Retângulos identificados com as mesmas cores representam animais de mesma gestação. Não há correlação entre as diferentes cores.

Figura 2 - Árvore genealógica da família 2, demonstrando os títulos de IgG anti-*N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s) e resultado da PCR nos fetos

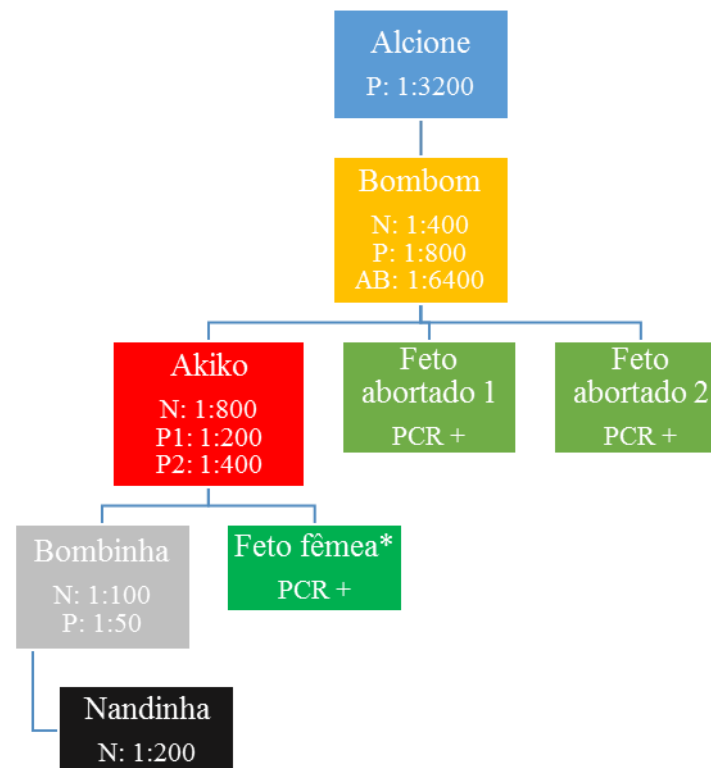


* Feto de mãe eutanasiada na última semana de gestação. Diagnóstico por PCR.

AB: Título de IgG anti-*N. caninum* no dia do aborto. N: Título de IgG anti-*N. caninum* ao nascimento. P1: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 1. P2: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 2. P3: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 3. P4: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 4.

OBS: Retângulos identificados com as mesmas cores representam animais de mesma gestação. Não há correlação entre as diferentes cores.

Figura 3 - Árvore genealógica da família 3, demonstrando os títulos de IgG anti-*N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s) e resultado da PCR nos fetos

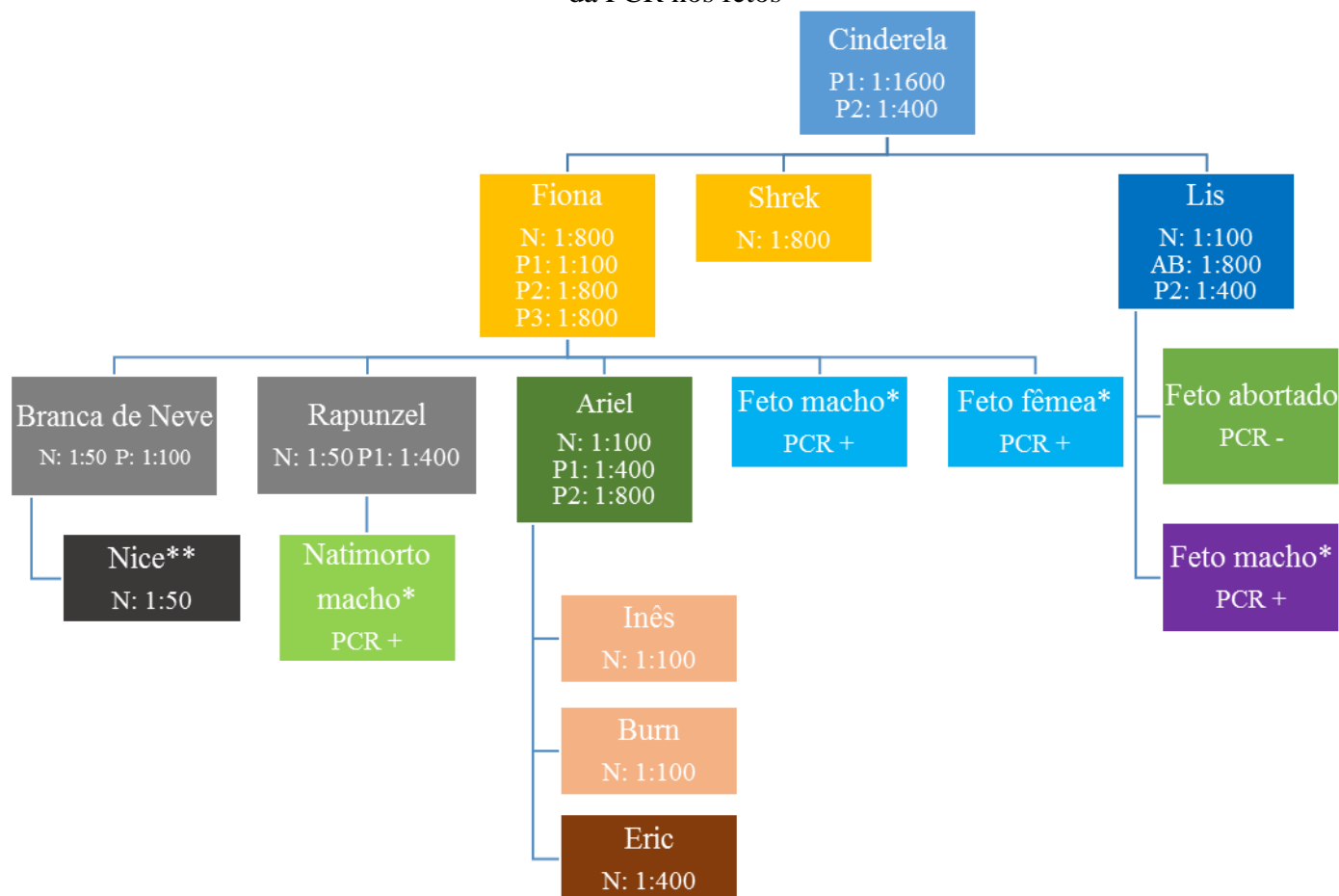


* Feto de mãe eutanasiada na última semana de gestação. Diagnóstico por PCR.

AB: Título de IgG anti-*N. caninum* no dia do aborto. N: Título de IgG anti-*N. caninum* ao nascimento. P1: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 1. P2: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 2.

OBS: Retângulos identificados com as mesmas cores representam animais de mesma gestação. Não há correlação entre as diferentes cores.

Figura 4 - Árvore genealógica da família 4, demonstrando os títulos de IgG anti-*N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s) e resultado da PCR nos fetos

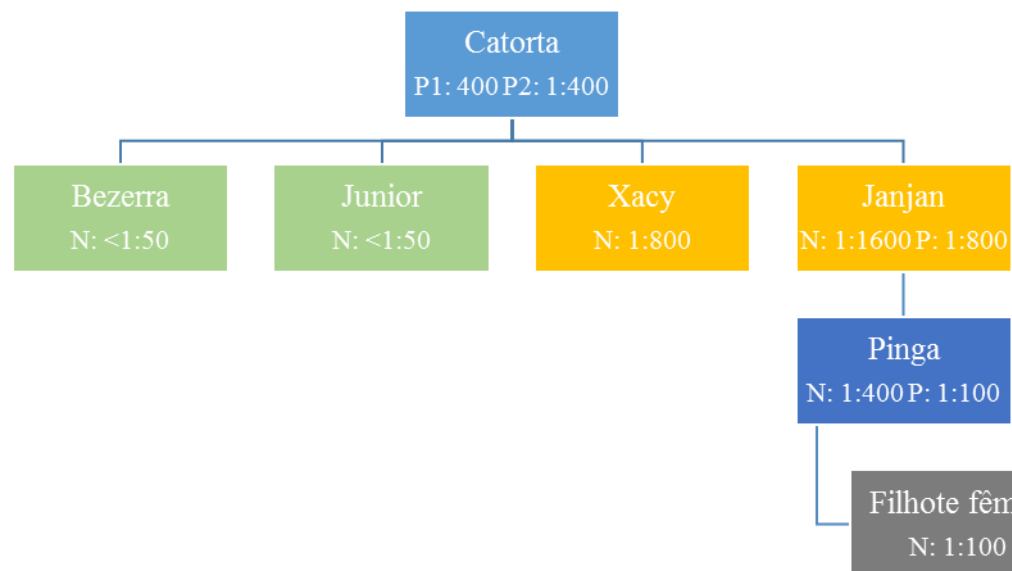


* Feto de mãe eutanasiada na última semana de gestação. Diagnóstico por PCR.

** Título de IgG anti-*N. caninum* três meses após o nascimento. AB: Título de IgG anti-*N. caninum* no dia do aborto. N: Título de IgG anti-*N. caninum* ao nascimento. P1: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 1. P2: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 2. P3: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 3.

OBS: Retângulos identificados com as mesmas cores representam animais de mesma gestação. Não há correlação entre as diferentes cores.

Figura 5 - Árvore genealógica da família 5, demonstrando os títulos de IgG anti-*N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s).

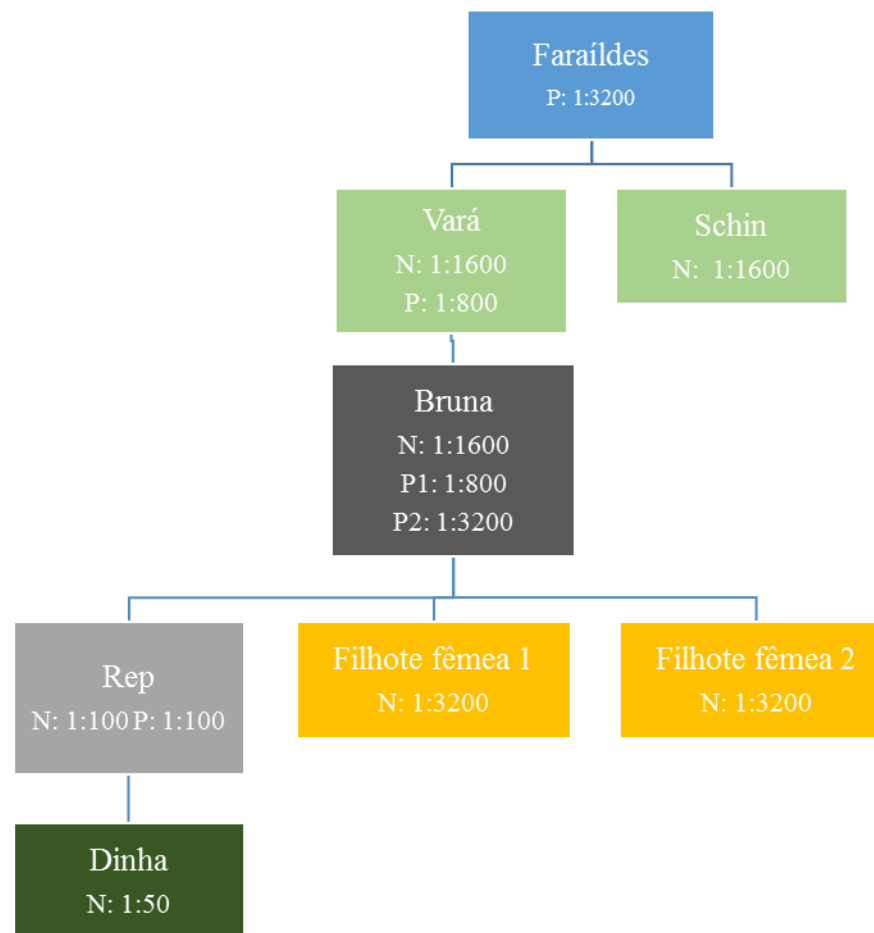


AB: Título de IgG anti-*N. caninum* no dia do aborto. N: Título de IgG anti-*N. caninum* ao nascimento. P1: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 1.

P2: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 2.

OBS: Retângulos identificados com as mesmas cores representam animais de mesma gestação. Não há correlação entre as diferentes cores.

Figura 6 - Árvore genealógica da família 6, demonstrando os títulos de IgG anti-*N. caninum* pela RIFI ao nascimento e ao(s) parto(s).



N: título de IgG anti-*N. caninum* ao nascimento. P1: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 1. P2: Título de IgG anti-*N. caninum* no parto 2.

OBS: Retângulos identificados com as mesmas cores representam animais de mesma gestação. Não há correlação entre as diferentes cores.

Tabela 1 – Resultados das análises histopatológica e molecular dos fetos.

Família/Animal	Histopatologia	PCR
Família 1/Feto Joaquina	Sem alterações	+
Família 1/Fetos machos Brisa 1 e 2	Miosite e miocardite linfoplasmocitária; manguitos perivasculares acentuados, gliose acentuada e focos de necrose no telencéfalo.	+
Família 2/natimorto Debrita	Sem alterações	+
Família 2/Feto Paquita	Cérebro e tronco cerebral com gliose focal moderada, manguitos perivasculares linfoplasmocitários com um cisto jovem e taquizoítos.	+
Família 2/Feto 1 e 2 Chumbada	Encefalite linfoplasmocitária multifocal discreta com cistos de <i>N.caninum</i> .	+
Família 2/Feto 3 e 4 Chumbada	Sem alterações	-
Família 3/Feto fêmea Akiko	Córtex cerebral com discretos manguitos perivasculares	+
Família 3/Bombom feto 1 e 2	Encefalite linfoplasmocitária multifocal moderada com cistos e taquizoítos de <i>N.caninum</i> .	+
Família 4/Fetos macho e fêmea Fiona	Sem alterações	+
Família 4/Feto macho Rapunzel 2014	Sem alterações	+
Família 4/Feto Lis 2014	Sem alterações	+

DISCUSSÃO

Não há trabalhos sobre taxas de transmissão congênita ou da cinética de anticorpos anti-*N. caninum* em sucessivas gerações de caprinos. Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa em uma única geração de cabras demonstrou-se aumento dos títulos de anticorpos IgG maternos durante a segunda metade da gestação e taxas de transmissão

endógena transplacentária de 73% em animais soropositivos (MESQUITA et al., 2013), as quais foram semelhantes a este trabalho que variaram de 71,43 a 100%, considerando as famílias individualmente, indicando que um animal positivo pode gerar um filhote negativo. Duas cabras apresentaram títulos de IgG anti *N. caninum* baixos no dia do parto. Na família 3, a cabra da quarta geração (Bombinha) apresentou titulação de 1:50 ao parto e na família 5 (Figura 5) a cabra da terceira geração (Pinga) apresentou titulação de 1:100. Provavelmente, nestas cabras, a infecção e a soroconversão ocorreram em fase inicial da gestação (MESQUITA et al., 2013), uma vez que elas pariram filhotes soropositivos no exame pré-colostral.

Em bovinos, a média de transmissão vertical nos rebanhos pode variar de 24 a 100% (BERGERON et al., 2000; DUBEY et al., 2017; MAGALHÃES et al., 2014; MAZUZ et al., 2014; WOUDA et al., 1999). Já em ovinos é descrita uma taxa de 92,9% de transmissão congênita, confirmada pela PCR (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014). Schares et al. (1998), estudando seis famílias (média geral de 2,4 gerações), demonstrou que 93% dos descendentes de vacas soropositivas foram positivos para *N. caninum*, sugerindo que a infecção por *N. caninum* pode se manter por várias gerações em um nível quase que constante de prevalência, aparentemente sem precisar da passagem do agente por um hospedeiro definitivo. Estes resultados são semelhantes aos descritos neste trabalho em caprinos, no qual os animais foram mantidos em ambiente fechado e livres do contato com prováveis hospedeiros definitivos e mantiveram uma taxa próxima da constante de transmissão vertical.

A taxa de distúrbios reprodutivos nos caprinos foi de 10,42%, semelhante aos 15,38% observados por Mesquita et al. (2013) em uma única geração de cabras e aos 18,2% observados por Wilson et al. (2016) em bovinos, no Canadá. Taxas maiores foram encontradas em bovinos no sul do Brasil, com 40% de abortos em vacas soropositivas (PESSOA et al., 2016). Nos caprinos deste estudo, os distúrbios reprodutivos ocorreram em animais com títulos de anticorpo anti-*N. caninum* a partir de 1:400 (Figuras 1 a 6), achados estes semelhantes aos encontrados por Varaschin et al. (2012) e diferentes de Mesquita et al. (2013), em que animais com títulos anti-*N. caninum* de 1:400 na RIFI pariram animais soronegativos. Apesar do número de caprinos avaliados neste estudo ser menor quando comparado aos bovinos, os abortos não aumentaram com o número de partições, diferindo de Wouda et al. (1999) e Mazuz et al. (2014), para os quais as taxas de abortos aumentaram com

o número de parições e, conseqüentemente, com a idade do animal. Mazuz et al. (2014) num rebanho bovino com neosporose endêmica em Israel, observaram que não houve significância estatística entre o nível de anticorpos anti- *N. caninum* durante a gestação e a proporção de abortos, entretanto 41,2 % das vacas com título de 1:12800 abortaram.

CONCLUSÃO

A infecção por *Neospora caninum* se manteve em todas as gerações das famílias de caprinos estudadas. O título de anticorpos anti-*N. caninum* nos descendentes foi flutuante (aumentando ou diminuindo) e não teve influência na transmissão congênita do parasito. O número de gestações não diminuiu a taxa de transmissão congênita.

REFERÊNCIAS

- Almeria, S., De Marez, T., Dawson, H., Araujo, R., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., 2003. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunology*, 25, 383-392.
- Bergeron, N., Fecteau, G., Paré, J., Martineau, R., Villeneuve, A., 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Can. Vet J.*, 41, 464-467.
- Björkman, C., Johansson, O., Stenlund, S., Holmdahl, O.J., Ugglå, A., 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 9, 1441-1444.
- Costa, R.C., Orlando, D.R., Abreu, C.C., Nakagaki, K.Y., Mesquita, L.P., Nascimento, L.C., Silva, A.C., Maiorka, P.C., Peconick, A.P., Raymundo, D.L., Varaschin, M.S., 2014. Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. *BMC Vet. Res.* 10, 291.
- Dijkstra, T.H., Barkema, H.W., Eysker, M., Beiboer, M.L., Wouda, W., 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.*, 100, 161-169.
- Dubey, J. P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals-The last five years. *Vet. Parasitol.*, 180, 90-108.
- Dubey, J.P., Hemphill, A., Schares, G., Calero-Bernal, R. (Eds). *Neosporosis in animals*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2017. p. 329-336.
- Figliuolo, L.P.C., Rodrigues, A.A.R, Viana, R.B., Aguiar, D.M., Kasai, N., Gennari, S.M., 2004. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, 55, 29-32.
- González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A, Regidor-Cerrillo, J., Benavides, J., Álvarez-García, G., Fuertes, M., Ortega-Mora, L.M., Mezo, M., 2014. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Veterinary Research*, 45, 88.
- Hernandez, J., Risco, C., Donovan, A., 2002. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. *J. Am Vet Med Assoc*, 221, 1742-1746.
- 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. *J. Comp. Pathol.* 131, 142-156.
- Magalhães, V.C.S., Oliveira, U.V., Costa, S.C.L., Santos, I.A., Pereira, M.J.S., Munhoz, A.D., 2014. Transmission paths o *Neospora caninum* in a dairy herd of crossbred cattle in the northeast of Brazil. *Vet. Parasitol.*, 202, 257-264.
- Mazuz, M.L., Fish, L., Reznikov, D., Wolkomirsky, R., Leibovitz, B., Savitzky, I., Golenser, J., Shkap, V., 2014. Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle. *Vet. Parasitol.*, 205, 85-91.

- Mesquita, L.P., Nogueira, C.I., Costa, R.C., Orlando, D.R., Bruhn, F.R., Lopes, P.F., Nakagaki, K.Y., Peconick, A.P., Seixas, J.N., Bezerra, P.S., Raymundo, D.L., Varaschin, M.S., 2013. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 196, 327–333.
- Mesquita L.P., Costa R.C., Nogueira C.I., Abreu C.C., Orlando D.R., Ascari Jr. I., Peconick A.P., Varaschin M.S. 2018. Placental lesions associated with abortion and stillbirth in goats naturally infected by *Neospora caninum*. *Pesq. Vet. Bras.*, 38, 444-449.
- Pessoa, G.A., Martini, A.P., Trentin, J.M., Dalcin, V.C., Leonardi, C.E., Vogel, F.S., Sá Filho, M.F., Rubin, M.I., Silva, C.A., 2016. Impact of spontaneous *Neospora caninum* infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in grazing lactating dairy cows. *Theriogenol.*, 85, 519–527.
- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Bärwald, A., Conraths, F. J., 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. *Vet. Parasitol.*, 80, 87-98.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1999. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 58, 1381-1385.
- Varaschin M.S., Hirsch C., Wouters F., Nakagaki K.Y., Guimarães A.M., Santos D.S., Bezerra Jr P.S., Costa R.C., Peconick A.P., Langohr I.M., 2012. Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. *Korean J. Parasitol.*, 50, 63-67.
- Wilson, D.J., Orsel, K., Waddington, J., Rajeev, M., Sweeny, A.R., Joseph, T., Grigg, M.E., Raverty, S.A., 2016. *Neospora caninum* is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. *Vet. Parasitol.*, 218, 46–51.
- Wouda, W., Bartels, C.J.M., Moen, A.R., 1999. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenol.*, 52, 233-245.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Cinética de anticorpos anti-*Neospora caninum* em diferentes gerações de cabras congenitamente infectadas", protocolo nº 017/18, sob a responsabilidade de Mary Suzan Varaschin, Djeison Lutier Raymundo, Angélica T. Barth Wouters, Fladimir Wouters e Ivam Moreira de Oliveira Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 28/03/2018.

Vigência da autorização: de 15/04/2018 a 31/07/2019

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Caprino / -

Número de animais aprovados: 33

Peso/idade: - / 1-6 anos

Sexo: fêmea

Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA): O soro a ser utilizado no experimento já foi coletado em projetos anteriores aprovados por este comitê de ética. Não sendo utilizado, portanto, animais vivos neste experimento.



Prof. Juliano Vogas Peixoto
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

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