



KAREN YUMI RIBEIRO NAKAGAKI

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DO *NEOSPORA*
CANINUM EM TECIDOS DE CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS**

LAVRAS-MG

2014

KAREN YUMI RIBEIRO NAKAGAKI

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DO *NEOSPORA CANINUM* EM
TECIDOS DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

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

Orientadora

Dra. Mary Suzan Varaschin

LAVRAS-MG

2014

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Nakagaki, Karen Yumi Ribeiro.

Estudo da distribuição do neospora caninum em tecidos de cabras naturalmente infectadas / Karen Yumi Ribeiro Nakagaki. – Lavras : UFLA, 2014.

69 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Mary Suzan Varaschin.

Bibliografia.

1. Músculo esquelético. 2. Sistema nervoso. 3. Biologia molecular. 4. Cabra. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.30896962

KAREN YUMI RIBEIRO NAKAGAKI

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DO *NEOSPORA CANINUM* EM
TECIDOS DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

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

APROVADA em 22 de maio de 2014.

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dr. Flademir Wouters	UFLA
Dra. Roselene Ecco	UFMG

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

LAVRAS-MG
2014

À minha Mãe (*in memoriam*),

Anjo que me deu a vida e que a vida me deu de presente....

Meu exemplo de luta, amor e fé.

A melhor parte de mim!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Todas as minhas conquistas e realizações são frutos de um trabalho feito em conjunto com Deus e pessoas maravilhosas com quem eu tive o privilégio de contar. Portanto, agradeço...

A Deus, pelas oportunidades concedidas e por iluminar sempre meus passos;

Ao meu pai Arnaldo, pelo amor e pela dedicação; pelo exemplo de otimismo, paciência e humildade; pelo sorriso acolhedor a cada volta minha para casa e por compreender tão bem minhas ausências;

À minha mãe Vera (*in memoriam*), minha fonte de inspiração, agradeço por toda força que representa, por sempre enfrentar comigo os desafios e se fazer presente em todos os momentos da minha vida, em cada passo, cada conquista, cada decisão;

À minha irmã e amiga Keiko, meu porto seguro, que sempre me apoiou, incentivou e me encorajou em todos os momentos da vida. A você, “hermana”, devo toda a minha gratidão, por abdicar dos seus objetivos e sonhos, permitindo realizar os meus, e por cuidar tão bem da nossa casa e da nossa família;

Ao Silas, meu amor, companheiro e amigo, obrigada por cuidar sempre tão bem de mim; pelas palavras de incentivo, paciência nos momentos difíceis e, sobretudo, pela fiel companhia em todos esses anos em Lavras. Sem você teria sido muito mais difícil!

À Camila, Kiyoko, Dj, Kaori, Di e Ba, sou grata de coração! Vocês foram o presente que esse mestrado me deu. Obrigada pelos jantares semanais maravilhosos, pela companhia, por me acolherem tão bem, por me permitirem fazer parte dessa família linda!! Não consigo imaginar esses anos (e os próximos) sem a companhia e o carinho de vocês!!

Agradeço ao “pessoal das cabras”, que deu o seu melhor, para garantir o bem-estar e a saúde desses animais.

Aos estagiários do Setor, sempre dispostos a ajudar, aprender e ensinar, pelos momentos de risadas e descontração. Agradeço, sobretudo, à Lismara, pelo auxílio e pela dedicação, principalmente nas longas e cansativas tardes de extração de DNA;

À Michele, pela amizade, pelas conversas, risadas e pelos desesperos (e quantos momentos de desespero, heim??!!)

À Pâmela, pela companhia e pelas risadas no laboratório e em congressos;

À minha orientadora Mary, exemplo de dedicação e otimismo, agradeço pelos importantes anos de convivência e aprendizado, por confiar no meu trabalho, pela amizade e pelos momentos de diversão;

Aos meus mestres Flademir, Dj, Pedro, Josi, Angélica, Ênio e Janquerle, sou grata por contribuírem para meu crescimento pessoal e profissional, serem meus exemplos de competência e dedicação e por me encantarem com o “fantástico mundo da patologia”. “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” (Cora Coralina).

À professora Ana Paula Peconick, pelo carinho e pela atenção a cada procura minha e por todo o auxílio na parte de biologia molecular;

À professora Angélica, sempre prestativa, pelo auxílio na revisão deste trabalho;

Aos membros desta banca, agradeço pela participação e a disponibilidade;

Aos professores, alunos e funcionários do Biopar, do Laboratório de Fisiologia Veterinária, Biotério, do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, obrigada por sempre me

receberem tão bem e por disponibilizarem espaço, equipamentos, materiais, tempo e atenção. Seria impossível a realização desse trabalho sem a ajuda de vocês!

Agradeço ao Sr. Welson e ao Rodrigues, por todo trabalho e assistência no laboratório;

Aos meus familiares (principalmente tio Toninho e família) e amigos que sempre torceram pelo meu sucesso;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

*“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso.
Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades; se estamos
possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los.
Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados
e despidos de orgulho.”*

Dalai Lama

RESUMO GERAL

Neospora caninum é um protozoário intracelular, considerado um dos principais agentes causadores de abortos e natimortos em cabras e em outras espécies animais. Este é o primeiro trabalho sobre a distribuição de *N. caninum* durante sua fase de latência em tecidos de animais naturalmente infectados. Neste estudo foram pesquisadas a distribuição das lesões e a presença de *N. caninum* em vários tecidos, com ênfase em musculatura esquelética e sistema nervoso, de cabras naturalmente infectadas, clinicamente sadias e que transmitiram verticalmente o parasito para sua prole. Para esse objetivo foram coletados fragmentos de tecidos de oito cabras para a realização de análises histopatológicas, imuno-histoquímicas (IHQ) e de biologia molecular. As lesões microscópicas observadas foram miosite não supurativa discreta a moderada em quatro cabras; no sistema nervoso central (SNC) foram visualizados manguitos perivasculares em cinco dos animais e gliose discreta a moderada em três. Em uma cabra foram encontrados taquizoítos na região de telencéfalo, tecido este positivo para *N. caninum* na reação em cadeia da polimerase (PCR). Na IHQ não foram visualizadas estruturas parasitárias. Na PCR, 37% das amostras coletadas foram positivas para *N. caninum*. Dentre os músculos esqueléticos, 72 de 168 (42,85%) amostras foram positivas e não foi demonstrada predileção do parasito por algum grupo muscular. No entanto, os músculos cleido-occipital, tríceps braquial e semimembrâneo tiveram maior proporção de amostras positivas (62,5%). No sistema nervoso 28/63 (44,44%) amostras foram positivas, sendo a região cervical da medula espinhal a mais frequentemente afetada (62,5%). Também houve resultados positivos na PCR para miocárdio (25%), trato digestório (25,6%), sistema reprodutor (28,6%), e fígado, pulmão, rim, baço e linfonodos (29,7%). Todas as amostras de pele foram negativas. O teste estatístico de qui-quadrado demonstrou que *N. caninum* tem 1,6 vezes mais chances de localizar-se na musculatura esquelética que nos demais tecidos. Os achados desse estudo reforçam que o SNC e a musculatura esquelética, principalmente os músculos cleido-occipital, tríceps braquial e semimembrâneo, são as principais localizações do protozoário nos animais adultos e constituem os tecidos de eleição para o diagnóstico da neosporose.

Palavras-chave: Protozoários. Músculos esqueléticos. Sistema nervoso central. Biologia molecular. Caprinos adultos.

GENERAL ABSTRACT

Neospora caninum is an intracellular protozoan considered one of the main agents responsible for abortion and stillborn fetuses in goats and other animal species. Systematic studies about the distribution of *N. caninum* in tissues of natural infected animals, during its latent period, are not found. This study investigated the distribution of the lesions and the presence of *N. caninum* in various tissues, with emphasis on skeletal muscles and central nervous system, of healthy and naturally infected goats that transmitted the parasite to their offspring. For this purpose 368 tissues samples from eight goats (46 tissues from each animal), were collected and submitted to histopathological, immunohistochemical (IHC) and molecular analysis. Microscopic lesions of discrete to moderate non-suppurative myositis were found in four goats; in the central nervous system perivascular cuffing were seen in five goats, and mild to moderate gliosis in three. In one goat tachyzoites were seen in the cerebral cortex, that was, also, positive in the polymerase chain reaction (PCR) test for *N. caninum*. By the IHQ test, parasitic structures were not visualized in the tissues. By PCR test, 37% of the collected samples were positive for *N. caninum*. Among skeletal muscles, 42.8 % of the samples were positive and there was no preference of the parasite for a muscle group. However, the muscles cleido-occipital, triceps and semimembranosus had a higher proportion of positive samples (62.5 %). In the central nervous system 44.4 % of samples were positive, with the cervical segment of the spinal cord been the most affected region (62.5 %). The groups, heart, digestive system, reproductive system and other tissues, were respectively 25 %, 25,6 %, 28,6 % and 29,7 % positive for *N. caninum* by PCR. All skin samples were negative in the PCR. The statistical chi-square test showed that *N. caninum* has 1.6 more chance to be located in skeletal muscle than in other tissues. The findings in this study reinforce that the central nervous system and skeletal muscles, specially the muscles cleido-occipital, triceps and semimembranosus, are the main locations of the protozoan in adult animals and these tissues should be collected for the diagnosis of neosporosis.

Keywords: *Neospora caninum*. Polymerase chain reaction. Adult goats. Skeletal muscles. Central nervous system.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Transmissão exógena e endógena de *N. caninum*..... 20

SEGUNDA PARTE

- Figura 1 *Neospora caninum* em cabras. Cabra H. Músculo estriado esquelético. Infiltrado inflamatório mononuclear moderado entre miofibras. HE. Barra: 50 µm 64
- Figura 2 *Neospora caninum* em cabras. Cabra D. Substância branca do telencéfalo. Manguito perivascular mononuclear acentuado. HE. Barra: 50 µm..... 65
- Figura 3 *Neospora caninum* em cabras. Cabra E. Telencéfalo. Gliose focal. HE. Barra: 50 µm..... 66
- Figura 4 *Neospora caninum* em cabras. Cabra A. Telencéfalo. Coleção de taquizoítos de *N. caninum*. HE. Barra: 25 µm. No detalhe, taquizoítos em maior aumento. HE..... 67
- Figura 5 *Neospora caninum* em cabras. Detecção de *Neospora caninum* por PCR. 1: marcador de peso molecular (100 pb). 2: controle negativo. 3: controle positivo. 4-15: DNA das amostras de tecidos das cabras..... 68

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

Tabela 1	Músculos avaliados de oito cabras naturalmente infectadas por <i>N. caninum</i> , ocorrência de lesão histológica (miosite) e resultado na pesquisa de <i>N. caninum</i> por PCR.....	60
Tabela 2	Áreas do sistema nervoso avaliadas de oito cabras naturalmente infectadas por <i>N. caninum</i> , ocorrência de lesão histológica (manguitos perivasculares e gliose) e resultado na pesquisa de <i>N. caninum</i> por PCR.....	62
Tabela 3	Porcentagem de tecidos positivos para <i>Neospora caninum</i> , por cabra.....	63

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>Neospora caninum</i> : ciclo de vida e formas de transmissão.....	17
2.2	Patogenia e sinais clínicos.....	20
2.3	Métodos diagnósticos	22
2.3.1	Testes sorológicos.....	22
2.3.2	Lesões macroscópicas e microscópicas.....	23
2.3.3	Imuno-histoquímica (IHQ).....	25
2.3.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>N.caninum</i>	26
2.4	Profilaxia e controle.....	27
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERÊNCIAS	30
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	38
	ARTIGO “DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES E DE <i>N. caninum</i> EM CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS”	39
1	INTRODUÇÃO	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
3	RESULTADOS	46
4	DISCUSSÃO	49
5	REFERÊNCIAS	53
	ANEXO	69

PRIMEIRA PARTE

Referencial teórico de *Neospora caninum*

1 INTRODUÇÃO GERAL

Neospora caninum é um protozoário Apicomplexa que pertence à família Sarcocystidae (DUBEY et al., 1988), sendo estruturalmente muito semelhante a *Toxoplasma gondii* (MINEO et al., 2001). Canídeos domésticos e selvagens são considerados hospedeiros definitivos (HD) de *N. caninum* (DUBEY et al., 2011; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; McALLISTER et al., 1998) e várias espécies animais, entre elas o próprio canino e os ruminantes são descritos como hospedeiros intermediários (HI) (DUBEY et al., 2011).

N. caninum é considerado atualmente como a principal causa de aborto em bovinos em vários países (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000; DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY, 2003), porém estudos têm sido conduzidos para determinar sua participação nos casos de aborto e na transmissão congênita em outras espécies animais, como os caprinos (MESQUITA et al., 2013). Mesquita et al. (2013), demonstraram que a taxa de transmissão congênita pode chegar a 77% em caprinos.

Embora existam inúmeras pesquisas sobre *N. caninum*, há lacunas que necessitam de esclarecimento, principalmente no que se refere à patogenia da infecção pelo protozoário (TOSCAN et al., 2012). Estudos realizados em roedores têm demonstrado resultados interessantes em relação à patogenia, à distribuição e à multiplicação de *N. caninum*. A determinação das regiões com maior probabilidade de localização dos cistos nos tecidos dos HI tem grande importância para o diagnóstico, bem como para a compreensão da patogênese e para adoção de medidas preventivas, como foi sugerido por Toscan et al. (2012).

O músculo esquelético é um local de grande importância no ciclo do parasito, onde possivelmente o protozoário permanece em latência. Além disso, é uma importante fonte de infecção para os HD, já que estes não precisariam ter

acesso ao tecido nervoso para se infectarem, pois esse está protegido por estruturas ósseas (PETERS et al., 2001). É importante ressaltar que, na maioria dos estudos sobre a distribuição de *N. caninum* nos tecidos dos HI, o músculo esquelético não está entre as amostras colhidas para análise (PETERS et al., 2001).

O objetivo com este estudo foi avaliar a distribuição das lesões e a presença de *N. caninum*, principalmente durante sua fase de latência, em vários tecidos, por meio das técnicas de histopatologia, imuno-histoquímica (IHQ) e de biologia molecular, em fêmeas caprinas adultas, naturalmente infectadas, clinicamente sadias e que transmitiram verticalmente o protozoário para sua prole.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Neospora caninum*: ciclo de vida e formas de transmissão

N. caninum pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina e família Sarcocystidae, assim como os gêneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* e *Besnoitia* (DUBEY et al., 1988). Os integrantes da família Sarcocystidae se caracterizam por apresentarem ciclo biológico heteroxeno, ou seja, formam cistos em HI de diferentes espécies animais e possuem como HD diferentes espécies de carnívoros, que eliminam oocistos nas fezes, os quais esporulam no ambiente, com formação de dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (DUBEY et al., 2002).

O agente foi primeiramente reconhecido como um esporozoário com formação de cistos, associado a casos de encefalomielite e miosite em cães (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984) e, posteriormente, foi isolado e descrito como um novo gênero – *Neospora*; e classificado em uma nova espécie - *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988).

O cão (*Canis lupus familiaris*) foi o primeiro HD identificado para *N. caninum* (McALLISTER et al., 1998) e, posteriormente, outros membros da família Canidae, como o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo-cinzento, (*Canis lupus*) também foram descritos como HD (DUBEY et al., 2011).

Apesar de o bovino ser o HI mais frequentemente acometido pela neosporose, *N. caninum* tem sido descrito acometendo ovinos (DUBEY et al., 2003), caprinos (DUBEY et al., 2003, MESQUITA et al., 2013), bubalinos (RODRIGUES; GENNARI; AGUIAR et al., 2004), equinos (DUBEY; PORTERFIELD, 1990) e animais selvagens, assumindo grande importância em

distúrbios reprodutivos dessas espécies (BARR et al., 1992; FERROGLIO et al., 2003).

O ciclo de vida do parasito apresenta três estágios distintos: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos. Os taquizoítos têm formato globular ou ovoide e medem cerca de 7 x 2 μm . Na célula hospedeira estão inseridos em um vacúolo parasitóforo desprovido de membrana (DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos podem ser encontrados em diversas células, tais como células do SNC, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, hepatócitos, miócitos e células tubulares renais (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os cistos de *N. caninum* são encontrados mais frequentemente no tecido nervoso, possuem formato arredondado a ovalado, são revestidos por uma parede espessa de até 4 μm e contêm bradizoítos no seu interior. Esses são alongados, medem cerca de 8 x 2 μm e possuem um núcleo subterminal característico (DUBEY et al., 2002).

Os oocistos são as formas liberadas nas fezes do HD e medem cerca de 12 x 10 μm . Possuem membrana transparente com 0,6-0,8 μm de espessura e contêm dois esporocistos. No interior de cada esporocisto há quatro esporozoítos alongados com cerca de 6,5 x 2,0 μm (DUBEY et al., 2002).

Os HI infectam-se pela ingestão de oocistos de *N. caninum* liberados no ambiente com as fezes dos HD (GONDIN et al., 1999). Nos HI, alguns esporozoítos atingem os mais diversos órgãos através da circulação linfática ou sanguínea e recebem o nome de taquizoítos. Nos órgãos e tecidos os taquizoítos se reproduzem com grande rapidez, resultando em necrose. Na vaca prenhe os taquizoítos podem atingir o feto, causar lesões fetais e necrose em placentomas, induzindo então o abortamento (GONDIN et al., 1999). Eventualmente o parasito pode atingir a glândula mamária e ser eliminado pelo leite (GONDIN et al., 1999).

Em bovinos, *N. caninum* é transmitido muito eficientemente, e tanto a transmissão horizontal como a vertical são consideradas importantes na epidemiologia da neosporose (Figura 1) (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Por outro lado, a taxa de transmissão horizontal no rebanho é baixa, com menos de 8% dos animais com soroconversão, isto é, animais negativos que passam a ser soropositivos (DIJKSTRA et al., 2003).

Trees e Williams (2005) sugeriram que, na neosporose em bovinos, dois tipos de transmissão vertical podem ocorrer (Figura 1), denominando-as endógena e exógena. A infecção transplacentária endógena ocorre como resultado da recrudescência de uma infecção crônica persistente durante a gestação; e a infecção transplacentária exógena resulta da infecção durante a gestação de uma fêmea não infectada. Diversos estudos em bovinos demonstraram que a via de transmissão vertical ou congênita de *N. caninum* é considerada a mais importante e pode ocorrer por diversas gerações. Essa capacidade elevada de transmissão vertical também foi demonstrada por Mesquita et al. (2013) em caprinos, em que a taxa de transmissão da mãe para sua progênie foi de 77%.

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

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

Não há evidências de que a infecção por *N. caninum* seja zoonótica (DUBEY et al., 2003), porém relatos de soropositividade em humanos não permitem descartar a possibilidade de infecção humana por esse parasito (NAM; KANG; CHOI, 1998).

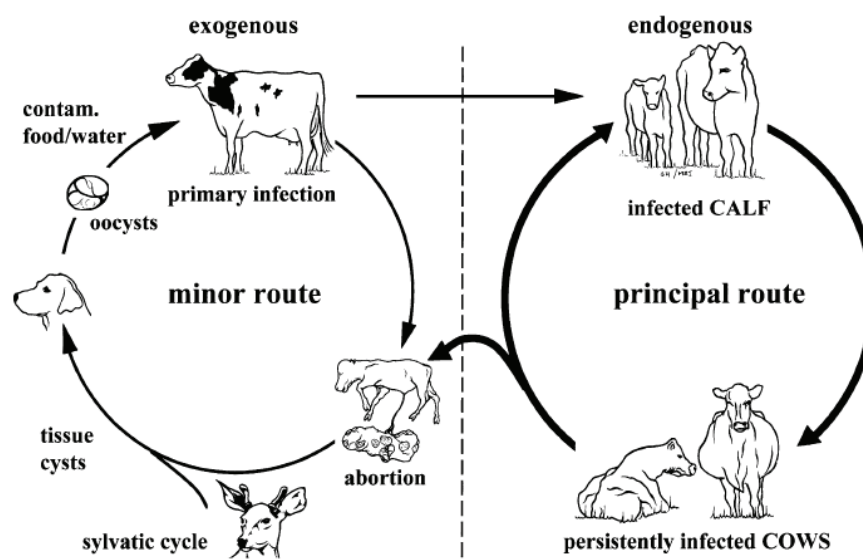


Figura 1 Transmissão exógena e endógena de *N. caninum* (Dubey et al.2006)

2.2 Patogenia e sinais clínicos

Uma vez no organismo, os taquizoítos podem infectar as células de quase todos os tecidos do animal, mas possuem maior tropismo por células do SNC, musculares esqueléticas e cardíacas e células endoteliais (BARR et al., 1991).

Os taquizoítos dividem-se rapidamente nas células do HI durante a fase de infecção aguda, induzindo áreas de necrose e disseminação da infecção para vários tecidos (MÜLLER et al., 2002). Eles penetram na célula por invasão ativa em menos de cinco minutos, localizando-se posteriormente no citoplasma celular, no interior de um vacúolo parasitóforo. Após a ruptura celular os taquizoítos vão para o meio extracelular e, em poucas horas, iniciam os mecanismos de adesão e invasão de novas células. A destruição celular e a enfermidade dependem da habilidade do taquizoíto em penetrar e multiplicar-se na célula hospedeira e da habilidade do hospedeiro em inibir a multiplicação do parasito (HEMPHILL; GOTTSTEIN; KAUFMANN, 1996).

A capacidade de replicação e as consequentes lesões teciduais causadas por *N. caninum* podem levar ao aparecimento de doença neuromuscular severa em cães e outros hospedeiros, com destruição de elevado número de células neurais, incluindo aquelas dos nervos craniais e espinhais, e reflexos na condutividade das células afetadas (MAYHEW et al., 1991).

Danos à placenta materna causados pelos taquizoítos podem matar o feto por interrupção do fornecimento de nutrientes e oxigênio (DUBEY et al., 1992). As lesões associadas a *N. caninum* no encéfalo e no coração de fetos abortados podem ser suficientemente severas para matá-lo. Além disso, há evidências de que a infecção por *N. caninum* também desencadeie a liberação de citocinas pró-inflamatórias e resposta imune tipo Th1 na interface materno-fetal, que pode ser prejudicial para a gestação (INNES et al., 2005).

A infecção ao final da gestação resulta em nascimento de bezerros congenitamente infectados, mas clinicamente normais, uma vez que o feto é capaz de desenvolver defesa imunológica competente frente ao patógeno (GONZÁLEZ et al., 1999). Altos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* podem ser demonstrados no soro desses animais (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). Até 95% dos bezerros infectados congenitamente podem nascer

cl clinicamente normais e, apesar da infecção subclínica ser a forma mais frequente da neosporose congênita, também têm sido descritos casos de bezerros infectados congenitamente, que apresentaram manifestação neurológica como consequência da presença de cistos no SNC (DUBEY; LINDSAY, 1996).

No bovino adulto, o principal sinal clínico observado na neosporose é o aborto, que pode ocorrer em qualquer época do ano e apresentar-se de forma esporádica, endêmica ou em surtos. Ocorre principalmente entre o quinto e o sétimo mês de gestação e as vacas soropositivas estão mais sujeitas ao abortamento que as soronegativas (DUBEY, 2003).

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

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

2.3 Métodos diagnósticos

2.3.1 Testes sorológicos

A crescente importância da infecção por *N. caninum* nas diferentes espécies domésticas e selvagens tem conduzido ao desenvolvimento de diversas provas indiretas, que utilizam extratos antigênicos e antígenos de taquizoítos de *N. caninum*, para detecção de anticorpos (ATKINSON et al., 2000). Testes

sorológicos, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de aglutinação de *Neospora* (TAN) e vários testes de ensaio imunoenzimático (ELISA), foram desenvolvidos para o diagnóstico em cães, bovinos e outros animais potencialmente hospedeiros (ATKINSON et al., 2000).

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

Levantamentos sorológicos têm sido realizados em várias partes do Brasil. Nos rebanhos caprinos estudados no sul de Minas Gerais foi obtida frequência de 10,7% (VARASCHIN et al., 2011), sendo esta maior que as relatadas por outros autores que utilizaram a mesma metodologia para *N. caninum*; 1,05% em caprinos testados no município de Mossoró, RN (LIMA et al. 2008); 3,3% em Patos, PB, (FARIA et al. 2007); e 6,34% no estado de São Paulo (FIGLIUOLO et al. 2004).

2.3.2 Lesões macroscópicas e microscópicas

Os fetos bovinos abortados, frequentemente autolisados, raramente apresentam lesões macroscópicas. Porém, podem ser observadas mumificação fetal (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003), malformações congênitas, como hidrocefalia e estreitamento do canal vertebral (DUBEY; SCHARES, 2006); e pequenas áreas esbranquiçadas que se aprofundam na musculatura esquelética e cardíaca ao corte do tecido (BARR et al., 1991).

Em caprinos lesões macroscópicas associadas à neosporose são escassas, sendo descritos somente hidrocefalia com hipoplasia cerebelar (DUBEY et al. 1996) e um quadro de porencefalia, caracterizado por ausência de substância branca cerebral, com conseqüente dilatação dos ventrículos

laterais pela perda tecidual adjacente (hidrocefalia ex-vácuo) (VARASCHIN et al., 2012).

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

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

As lesões mais frequentemente encontradas no SNC são encefalomielite (BOULTON et al., 1995) ou encefalite mononuclear multifocal, associada ou não a um ou vários focos de gliose, que muitas vezes circundam os focos de necrose (DUBEY; LINDSAY, 1996; VARASCHIN et al., 2012). Estruturas parasitárias podem estar associadas ou distantes da lesão (VARASCHIN et al., 2012). Também podem ocorrer áreas de mineralização no SNC (BOULTON et al., 1995). As lesões tendem a ocorrer mais frequentemente no córtex cerebral do que na porção média e superior do tronco cerebral. Em trabalhos realizados em bezerros, foi observado que o hipocampo, o hipotálamo e a amígdala cerebral são, em particular, locais com mais chances de se achar o parasito (NISHIMURA et al., 2013).

Tipicamente, lesões miocárdicas consistem em infiltrado de células mononucleares, com necrose discreta. Lesões hepáticas são caracterizadas por infiltrados periportais de células mononucleares e escassas áreas de necrose hepatocelular (DUBEY; SCHARES, 2006).

Estruturas de *N. caninum* são raramente encontradas em cortes histológicos em bezerros ou bovinos adultos, mesmo em animais com doença

clínica. *N. caninum* foi observado em apenas um de seis bezerros de duas semanas de idade, que nasceram com sinais neurológicos e que tinham anticorpos anti-*N. caninum* pré-colostrais, o qual apresentava também lesões microscópicas de encefalomielite (De MEERSCHMAN et al., 2005).

Sawada et al. (2000) relataram gliose e manguitos perivasculares no SNC, miosite e miocardite focal, além de infiltrado de células mononucleares no fígado e no rim de uma vaca; o diagnóstico de neosporose foi feito por isolamento do parasito em cultivo celular. Bishop et al. (2010) encontraram meningoencefalite não supurativa aguda e mielite não supurativa moderada em um ovino, do qual foi detectado DNA de *N. caninum* por PCR.

2.3.3 Imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ, que utiliza anticorpo anti-*N. caninum* tem sido empregada como um método eficaz para identificação de cistos e taquizoítos em tecidos fetais (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003; LINDSAY; DUBEY, 1989). Esta técnica facilita a visualização de estruturas parasitárias nos tecidos, sendo também extremamente importante nas fases iniciais e/ou em lesões discretas (CORBELLINI et al., 2002). No entanto, a IHQ apresenta melhores resultados quando realizada após estudo histopatológico, em que são selecionados fragmentos de SNC e/ou outros tecidos com lesões sugestivas de neosporose (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994). A detecção do antígeno de *N. caninum* pela IHQ nas lesões é a melhor evidência para etiologia do aborto (DUBEY; SCHARES, 2006).

Uma vez que a manifestação do aborto é mais frequente nas fases mais avançadas da gestação (LÓPEZ-GATIUS; PABÓN; ALMERÍA, 2004) a IHQ permite visualização precoce do parasito nos tecidos, sendo uma das formas de caracterizar a transmissão congênita de *Neospora caninum*. É descrita como uma

técnica de alta especificidade, porém pouco sensível (VAN MAANEN et al., 2004).

Por meio da IHQ são descritos números variáveis de taquizoítos marcados, mais frequentes no encéfalo e em menor número de casos no miocárdio (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998). Os cistos ocorrem em pequena quantidade no encéfalo e podem não estar associados a lesões (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998, VARASCHIN et al., 2012). Em estudos experimentais em camundongos nude há descrição de taquizoítos em células endoteliais, no estroma do endométrio, no epitélio e em restos celulares de oviduto, ovário, pâncreas, pulmão, encéfalo, estômago, músculo esquelético, intestino, língua, baço, medula espinhal, fígado, rins e coração (SHIBAHARA et al., 1999).

2.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para *N.caninum*

A eficácia do diagnóstico por PCR depende do grau de preservação da amostra e dos procedimentos de amostragem. A detecção do DNA de *N. caninum* pela PCR é um método mais sensível que a IHQ (DUBEY; SCHARES, 2006).

A viabilização das técnicas de diagnóstico molecular, baseadas na detecção de porções do genoma de *N. caninum* ofereceu, entre outros benefícios, a possibilidade de superar alguns problemas de diagnóstico, principalmente em relação à sensibilidade insuficiente (MEDINA et al., 2006; PAYNE; ELLIS, 1996). Desde meados da década de 90, várias estratégias foram desenvolvidas nesse sentido, destacando-se as técnicas de sequenciamento de material genômico clonado (MARSH et al., 1995), PCR simples e “Nested” PCR (ELLIS, 1998; PAULA et al., 2004), testes de hibridização de DNA

(KAUFMANN et al., 1996; MULLER et al, 1996), “multiplex” PCR (MESECK et al., 2005) e “real-time” PCR (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

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

Uma série de estudos indica que o tecido encefálico é o mais adequado para a detecção de DNA de *N. caninum* por PCR, seguido por coração, pulmões e rins (DUBEY; SCHARES, 2006).

2.4 Profilaxia e controle

As medidas de prevenção e controle da neosporose podem, muitas vezes, tornar-se economicamente inviáveis ou pouco práticas. Em rebanhos bovinos os programas de controle são baseados na diminuição do risco da transmissão horizontal do parasito, principalmente por meio do controle da população de hospedeiros definitivos, os quais são fontes de contaminação pela excreção de oocistos nas fezes (ORTEGA-MORA; FERNÁNDEZ-GARCÍA; GÓMEZ-BAUTISTA, 2006). Deve se evitar também que os carnívoros, principalmente de áreas rurais, se alimentem de carne e/ou vísceras cruas, impedindo seu acesso a fetos abortados, membranas fetais, placentas ou natimortos (DIJKSTRA et al., 2002).

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

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

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

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo mostram que o DNA de *N. caninum* está presente em vários tecidos de cabras, naturalmente infectadas e que a musculatura esquelética possui 1,6 vezes mais chances de conter o DNA de *N. caninum* que outros tecidos/órgãos. Entretanto, as análises estatísticas não demonstraram predileção do parasito por determinado grupo muscular ou determinada região do sistema nervoso. Observou-se também que a pele e o sistema digestório são os locais com menor chance de identificação de material genético do protozoário. Na análise histopatológica lesões moderadas sugestivas de neosporose foram encontradas no SNC de seis cabras, no entanto, estruturas parasitárias só foram observadas em um animal. Já, na musculatura esquelética, as lesões encontradas foram pouco significativas quando comparadas com as lesões descritas para fetos abortados. Na PCR, a maior proporção de resultados positivos foi de 62,5% nos músculos cleido-occipital, tríceps braquial e semimembranáceo, e na medula espinhal cervical. Constatou-se que a identificação de cistos e/ou taquizoítos de *N. caninum* em cabras é rara, sendo necessária a utilização de provas mais sensíveis, como a PCR, para detecção desse parasito.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-GARCIA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos.** 2003. 279p. Tese (Doutorado) – Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.
- ANDERSON, M. L.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n. 3, p. 439-461, 1994.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.417-431, 2000.
- ATKINSON, R. et al. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, v. 16, p. 110-114, 2000.
- BJERKÅS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v.70, n.2, p.271–274, 1984.
- BARLING, K. S. et al. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 217, p. 1356-1360, 2000.
- BARR, B. C. et al. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 28, p. 110-116, 1991.
- BARR, B.C. et al. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, p. 365-367, 1992.
- BISHOP, S., et al. The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, p. 137-142, 2010.
- BOULTON, J. G. et al. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 72, p. 119-120, 1995.

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

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

CSTOWELL, K.M.; GILLESPIE, L. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.122, p. 307-315, 2004.

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

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

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

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

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

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

DUBEY, J.P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 193, p.1269-1283, 1988.

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

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

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

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

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

DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 76, n. 5, p.732-734, 1990.

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

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

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

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

FERROGLIO, E. et al. Antibodies to *Neospora caninum* in wild animals from Kenya, East Africa. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, p. 43-49, 2003.

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

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

GONDIM, L.F. P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 86, p.71-75, 1999.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MAYHEW, I. G. et al. Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. **Journal Small Animal Practice**, Canadá, v. 32, p. 609-612, 1991.

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

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

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

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

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, 2001.

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

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

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

NAM, H. W., KANG, S. W., CHOI, W. Y. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 36, p. 269-275, 1998.

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

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

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

PAULA, V.S. et al. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.581-585, 2004.

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

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

PFEIFFER, D. V. et al. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, p. 11–24, 2002.

REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

RODRIGUES, A.A.R.; GENNARI, S.M.; AGUIAR, D.M. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 139-150, 2004.

SAWADA, M. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 247-252, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

ARTIGO

(Este artigo será submetido à revista *Veterinary Parasitology*)

**DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES E DE *N. caninum* EM CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS****STUDY OF THE LESIONS AND *N. caninum* DISTRIBUTION IN
NATURALLY INFECTED GOATS****Resumo**

Com o presente estudo foi avaliada, por análise histopatológica, imuno-histoquímica e de biologia molecular a distribuição das lesões e de *N. caninum* em tecidos e órgãos de oito cabras naturalmente infectadas, clinicamente sadias e que transmitiram congenitamente o protozoário para suas crias. Na histopatologia foi encontrado infiltrado inflamatório mononuclear discreto em músculos esqueléticos (10/168; 1,68%) e no miocárdio de dois caprinos. Manguitos perivasculares foram a lesão mais importante no sistema nervoso central, observados em 62,5% das cabras estudadas; havia gliose discreta a moderada em 37,5% dos animais e, no telencéfalo de uma cabra, foi visualizado um grupo de taquizoítos, o qual não estava associado a reação inflamatória. Na reação em cadeia da polimerase (PCR), de 359 amostras analisadas, 133 (37%) foram positivas; as regiões com maiores porcentagens de amostras positivas foram sistema nervoso (28/63; 44,4%) e musculatura esquelética, (72/168; 42,8%). Na análise individual, os tecidos que tiveram maior porcentagem de amostras positivas na PCR foram os músculos cleido-occipital, tríceps braquial e semimembranáceo e a medula espinal - segmento cervical (todos com 62,5%). Não foram evidenciadas estruturas parasitárias pela imuno-histoquímica (IHQ)

nos tecidos dos oito caprinos. A análise estatística demonstrou, com associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), que *N. caninum* tem 1,6 vezes mais chances de estar presente na musculatura esquelética que nos demais tecidos. Este é o primeiro estudo sobre a distribuição de *Neospora caninum* nos tecidos de fêmeas caprinas adultas.

1. Introdução

Neospora caninum é um protozoário Apicomplexa, considerado uma das principais causas de aborto em bovinos de todo o mundo (Dubey et al., 2007). Em caprinos tem se mostrado um importante agente causador de abortos e natimortos, além de ser responsável por elevada taxa de transmissão congênita (Mesquita et al., 2013).

A forma de latência de *N. caninum* consiste em cistos teciduais, que são tipicamente encontrados no tecido nervoso ou em células musculares esqueléticas (Dubey et al., 1990) e podem persistir durante toda a vida do hospedeiro intermediário (HI) sem manifestações clínicas significativas (Dubey & Lindsay, 1996). A ocorrência de cistos em músculos esqueléticos dos HI pode facilitar a infecção dos carnívoros, considerados hospedeiros definitivos, uma vez que estes não precisam ter acesso ao sistema nervoso central (SNC) de carcaças presentes no campo para se infectar (Peters et al., 2001).

Algumas pesquisas têm confirmado a presença de *N. caninum* em músculo masseter, coração e fígado de bovinos adultos e em cérebro de bovinos e búfalos adultos, naturalmente infectados, por meio de bioensaios em cães

(Gondim et al., 2002; Rodrigues et al., 2004; Cavalcante et al., 2011), ou por IHQ e PCR em encéfalo de bezerros, após infecção experimental (Ho et al., 1997; Kritznner et al., 2002; Nishimura et al., 2013). O parasito também foi descrito no SNC de uma vaca (Sawada et al., 2000) e de uma ovelha prenhe (Koyama et al., 2001), com confirmação diagnóstica por isolamento do parasito; e em um carneiro confirmado por PCR positiva para *N. caninum* (Bishop et al., 2010).

O objetivo com este estudo foi descrever as lesões e a distribuição de *N. caninum* em vários tecidos, com ênfase na musculatura cardíaca e esquelética e no SNC, de cabras naturalmente infectadas, clinicamente normais, e que transmitiram verticalmente o parasito para sua prole. Ressalta-se a contribuição do conhecimento dos tecidos mais afetados por *N. caninum* para o diagnóstico e a adoção de medidas preventivas.

2. Material e métodos

O estudo foi realizado no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Minas Gerais, Brasil, mediante aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais desta mesma instituição (Protocolo nº 028/13) (Anexo 1).

2.1. Animais

Foram utilizadas oito cabras (A-H) de um a sete anos de idade, naturalmente infectadas por *N. caninum* (titulação de 1:100 a 1:6400 pela reação de imunofluorescência indireta - RIFI) e soronegativas para *Toxoplasma gondii*. Os animais foram mantidos em baias durante a noite e soltos em piquete telado e isolado durante o dia, com comida e água *ad libitum*. Foram submetidas à eutanásia usando anestesia profunda com tiopental e posterior infusão intravenosa de solução de cloreto de potássio. Como controle foram utilizados dois caprinos negativos para *N. caninum* e *T. gondii*.

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

Na necropsia foram coletados 46 fragmentos de tecidos/órgãos de cada cabra, para os exames histopatológico, imuno-histoquímico e PCR, sendo: a) músculos esqueléticos (n=21) discriminados na Tabela 1; b) sistema nervoso (Tabela 2); c) miocárdio; d) sistema reprodutor: ovário, útero e glândula mamária; e) sistema digestório: esôfago; rúmen, retículo, omaso, abomaso, intestino delgado com placa de Peyer, válvula íleo-cecal, f) Pele; g) Outros: fígado, pulmão, rim, baço e linfonodos.

2.3. Exame histopatológico:

Os tecidos foram fixados em formol a 10% tamponado e processados rotineiramente para histopatologia. A pesquisa do parasito e avaliação de lesões histopatológicas foi realizada em microscopia ótica.

2.4. Teste de Imuno-histoquímica:

Os tecidos de todos os caprinos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica, usando o anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum* (VRMD, Pullman, USA), na diluição de 1:2200. A recuperação antigênica foi feita por digestão enzimática com tripsina 0,1% (pH 7,8) por 10 minutos a 37 °C, seguida pela recuperação pelo calor por dois minutos em tampão citrato (pH 6,0) e, para revelação, foi utilizado o cromógeno DAB (3,3 -diaminobenzidina, DAKO), (Corbellini et al., 2002). Como controle negativo o anticorpo primário foi substituído por soro fetal bovino e como controle positivo foram utilizadas amostras de SNC de caprinos contendo cistos de *N. caninum*.

2.5. Análise molecular

A extração do DNA celular foi realizada pela técnica de lise por proteinase K (Wizard SV Genomic Purification System, Promega, Madison, USA). As concentrações (ng/μl) e a qualidade do DNA extraído foram

determinadas em espectrofotômetro *NanoVue™ plus* e eletroforese em gel de agarose a 1,2%.

Para a detecção de *N. caninum*, foram sintetizados iniciadores (Sigma-Aldrich) para a amplificação de sequências genéticas do protozoário, tendo como molde o cromossomo XII e dando origem aos *primers forwards* CTGTTAGAAGGTGCGGCGAA e *reverse* TCTCTTGCTGCGGTGGAAT, que amplificam um fragmento de 168pb (pares de base), específicos para *N. caninum* (Orlando et al., 2013).

Os reagentes padrões utilizados para as reações foram (Go Taq® Flexi DNA Polymerase; set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega, Madison, USA). Como controle branco, o DNA template foi substituído por água ultra pura *Milli-Q* e, como controle positivo, foi utilizada amostra do sistema nervoso de um caprino naturalmente infectado por *N. caninum*.

As reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) conforme o seguinte protocolo: desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 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 0,09 M e EDTA 0,002 M)

como tampão de corrida. Com o auxílio de padrão de peso molecular (Ladder da Ludwig® 100PB 250 microlitros) as bandas foram identificadas.

Para confirmação de que o primer é espécie específico, foi feita a purificação do DNA do controle positivo e de uma amostra de SNC de uma cabra, utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). O sequenciamento genético foi realizado no sequenciador automático capilar ABI310 (Applied Biosystems) pelo método enzimático descrito por Sanger et al. (1977).

Para análise *in silico*, utilizou-se o programa BlastN (Altschul et al. 1990), para comparação com as sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no banco de dados do NCBI. As amostras sequenciadas, entre elas o controle positivo e amostra de telencéfalo de uma cabra demonstraram 100 (FR823393.1) e 99% (FR823393.1) de identidade com *N. caninum*.

2.6 Análise estatística

Para avaliar a existência de tropismo de *N. caninum* por determinados tecidos de cabras naturalmente infectadas, foram feitas análises estatísticas por meio do software *EpiInfo* 7.1.3. Os dados foram organizados em tabelas de contingência de dupla entrada (tecidos; positivos ou negativos), e submetidos aos testes de qui-quadrado (X^2). Como medida de associação foram calculadas as razões de possibilidades entre os tecidos e a positividade deles para *N. caninum*,

e avaliado seu intervalo de confiança a 95%. Considerou-se nível de significância mínimo de 95% em todas as análises estatísticas.

3. Resultados

3.1. Análise histopatológica e imuno-histoquímica

Das oito cabras estudadas, quatro (50%) apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear na musculatura esquelética (Tabela 1, Figura 1), com intensidade discreta (cabras A, F, G e H) a moderada (cabras F, G e H). Não foram observadas estruturas de *N. caninum*. Em duas cabras (B e C) foi observada miocardite linfoplasmocítica focal discreta.

No SNC, a principal lesão encontrada foi manguito perivascular mononuclear (Figura 2), visualizado em cinco cabras (62,5%). Foi observado em um ou mais locais do SNC (Tabela 2) e era acentuado (telencéfalo; cabra D) ou discreto (telencéfalo, tálamo e ponte; cabras A, D, F, G, H). Gliose focal (Figura 3) foi observada em três cabras (Tabela 2);, sendo moderada (telencéfalo; cabras D e E) e discreta no tálamo (cabras D e E), e no colículo rostral (cabra C).

Cinco caprinos (62,5%) apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear focal discreto no fígado.

Na cabra A foram observadas estruturas morfológicamente compatíveis com taquizoítos de *N. caninum* (Figura 4) na região de telencéfalo. A amostra

dessa região foi positiva na PCR. Na avaliação por IHQ não foi observada marcação de estruturas parasitárias.

Nas preparações em HE, foram visualizadas quantidades variadas de cistos de *Sarcocystis* sp., em 39 amostras de músculos.

Nos animais controle não havia lesões microscópicas.

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

No sequenciamento das 359 amostras analisadas, 133 (37%) foram positivas para *N. caninum* na PCR (Figura 5; Tabelas 1 e 2); destas, 72 (54,1%) amostras eram de músculos esqueléticos e 28 (21%) eram de sistema nervoso.

Dos grupos musculares coletados, 47,5% dos músculos da cabeça foram positivos para *N. caninum* pela PCR; 45% dos músculos dos membros pélvicos, 41,6% dos músculos do pescoço; 40% dos músculos da região tóraco-abdominal; e 37,5% dos membros torácicos, e a análise estatística não demonstrou predileção ($p \geq 0,05$) do parasito por determinado grupo muscular.

Das 63 amostras de encéfalo, 28 (44,4%) das amostras foram positivas na PCR (Tabela 2). Dos oito locais coletados do sistema nervoso, todas as regiões tiveram pelo menos 25% de amostras positivas para *N. caninum*, com maior índice de detecção nas amostras de segmento cervical da medula espinhal, (62,5%), porém sem diferença significativa ($p \geq 0,05$) em relação às demais regiões do sistema nervoso. Das amostras de fígado, pulmão, rim, baço e

linfonodos 29,7% foram positivas para *N. caninum* na PCR; dos órgãos do sistema reprodutor 28,6% (42,8% das amostras de ovário; 25% de glândula mamária e 16,7% das amostras de útero), porém sem diferença significativa de predileção entre estes órgãos; e do sistema digestório 25,9%. Todas as amostras de pele foram negativas.

O teste estatístico demonstrou que não há predileção de *N. caninum* para a musculatura esquelética em relação a sistema nervoso, coração, sistema reprodutor, fígado, pulmão, rim, baço e linfonodos ($p \geq 0,05$), porém, há mais chances de se encontrar DNA de *N. caninum* na musculatura esquelética do que no sistema digestório ($p = 0,026$; OR= 2,142; IC95% [1,084-4,234]); assim como é maior a chance de detecção no sistema nervoso quando comparado com o sistema digestório ($p = 0,037$; OR= 2,28; IC95% [1,041-5,015]).

Os maiores índices de identificação do DNA de *N. caninum* nos tecidos foram observados na cabra D, com 56,8% de positividade e cabra G, com 54,4% (Tabela 3).

Dos 39 músculos em que foram identificados cistos de *Sarcocystis* sp., 51,3% foram negativos na PCR para *N. caninum*.

O teste estatístico de qui-quadrado (χ^2) demonstrou, com associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), que *N. caninum* tem 1,6 vezes mais chances de estar presente na musculatura esquelética do que nos demais tecidos ($p = 0,032$; OR= 1,6; IC95% [1,038-2,459]).

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

4. Discussão

As lesões microscópicas na infecção por *N. caninum* são caracterizadas por encefalite mononuclear com focos de necrose e gliose, assim como miocardite e miosite mononuclear (Barr et al., 1990; Buxton et al., 1997; Corbellini et al., 2002; Varaschin et al., 2012; Mesquita et al., 2013). Segundo Dubey et al. (1998), taquizoítos ou cistos de *N. caninum* raramente são suficientemente numerosos para serem encontrados em todos os cortes histológicos, o que requer o uso de testes específicos e sensíveis, como a IHQ ou PCR (Van Maanen et al., 2004).

Nesse estudo, apesar da visualização de lesões compatíveis com neosporose, a PCR foi mais eficiente para a confirmação de *N. caninum* nos tecidos. Esses resultados são compatíveis aos descritos na literatura para animais adultos, em que o diagnóstico final só foi possível mediante isolamento do agente em cultivo celular ou por PCR (Sawada et al., 2000; Koyama et al., 2001; Bishop et al., 2010; Malaguti et al., 2012; Suteu et al., 2013).

Lesões inflamatórias sugestivas da infecção por protozoários foram encontradas nos tecidos das cabras investigadas, no entanto, somente 47,8% delas foram positivas na PCR para o parasito. Esses achados podem estar relacionados à possibilidade do parasito já ter sido eliminado do tecido, levando

a diferenças na distribuição das lesões e do DNA do protozoário, como foi observado por Nishimura et al. (2013) em um estudo de distribuição de *N. caninum* em tecidos de bovinos experimentalmente infectados, nos quais foram observadas muitas lesões no telencéfalo e em substância branca adjacente mas, as lesões não estavam concentradas em áreas positivas na PCR.

A proporção de amostras de músculos esqueléticos positivas na PCR foi alta (37,5% a 47,5%), entretanto não foi constatada predileção do parasito por um determinado grupo muscular. Verificou-se que *N. caninum* tem 1,6 vezes mais chances de ser detectado na musculatura esquelética que em outros tecidos, diferente do que foi relatado em alguns estudos, que indicaram ser o tecido encefálico o mais adequado para a detecção de DNA de *N. caninum*, seguido pelo coração, pelos pulmões e rins (Buxton, 1998; Gottstein et al., 1998; Collantes-Fernández et al., 2005).

No SNC, no nervo óptico e no gânglio trigeminal, 55,6% dos fragmentos avaliados pela PCR foram negativos. Os resultados negativos podem ser explicados como sendo devidos à falta de sensibilidade decorrente do baixo número e da distribuição aleatória de parasitos no encéfalo. Em outros trabalhos, as análises de PCR realizadas em diferentes porções do mesmo tecido também não foram sempre positivas, indicando que os parasitos não estavam uniformemente distribuídos nos tecidos (De Marez et al., 1999; Rodrigues et al.,

2004). No sistema nervoso de um mesmo animal houve resultados diferentes na PCR, variando de acordo com a região estudada.

O DNA de *N. caninum* pôde ser detectado por PCR em todos os tecidos coletados, exceto na pele. Esse resultado é mais abrangente do que resultados anteriormente descritos, que revelam detecção de material genético do protozoário apenas no cérebro e na medula espinhal de hospedeiros intermediários naturalmente infectados (Ho et al., 1997). Em animais experimentalmente infectados, a detecção de DNA em SNC (Nishimura et al., 2013), músculo esquelético, músculo cardíaco (Kritzner et al., 2002), pulmão e rim (Ho et al., 1997) foi descrita.

Nesse estudo não foram visualizados cistos de *N. caninum* nos tecidos. Alguns trabalhos indicam que *N. caninum* não produz cistos teciduais eficientemente (Weiss et al., 1999; Vonlaufen et al., 2004; Goodswen et al., 2013), em animais infectados naturalmente, e até mesmo em modelos experimentais, como ratos e gerbis (Goodswen et al., 2013). Também se acredita que, nos animais adultos, o parasito pode causar infecção crônica, ou o animal pode ser portador subclínico e imunologicamente protegido, dificultando a ocorrência de lesões e formação de cistos (Malaguti et al., 2012).

A infecção por *Sarcocystis* sp. é frequente em todo o mundo, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados por esporocistos, mas normalmente não é associada com infecção fetal ou aborto em cabras e ovelhas

(Buxton, 1998). Cistos de *Sarcocystis* sp. foram visualizados em 39 fragmentos de musculatura esquelética. Esse achado era esperado, uma vez que o estudo foi realizado em animais naturalmente infectados, em que co-infecções por outros protozoários formadores de cistos podem ocorrer (Peters et al., 2001). No entanto, o índice de amostras positivas na PCR não pode ser relacionado com uma possível amplificação de *Sarcocystis* sp., pois mais de 50% dos músculos que continham cistos do parasito foram negativos na PCR. Além disso, os cistos de *Sarcocystis* sp., foram negativos para *N. caninum* na IHQ e o sequenciamento confirmou ser o primer utilizado específico para *N. caninum* (Orlando et al., 2013).

A cabra D foi a que teve maior percentual de amostras positivas. Esses resultados podem estar relacionados ao fato dela ser a cabra mais jovem dos animais estudados e com parição mais recente. É sabido que a resposta Th1, regulada por citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α , importantes no controle de patógenos intracelulares, é negativamente regulada durante a gestação, em comparação à resposta Th2 (Wegmann et al., 1993). Essa modulação pode influenciar a recrudescência de infecção prévia persistente, com liberação de bradizoítos e parasitemia (Innes et al., 2001).

Os resultados obtidos com o presente estudo demonstraram que o DNA de *N. caninum* está presente em vários tecidos de cabras naturalmente infectadas, com maior índice de detecção de *N. caninum* nos músculos cleido-

occipital, tríceps braquial, semimembráceo e na medula espinhal cervical. Dessa forma, se indica incluir esses tecidos nas amostras coletadas para o diagnóstico da neosporose.

Agradecimentos

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo auxílio financeiro e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado.

5. Referências

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Molec. Biology.*, 215, 403–410.

Barr, B.C., Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Daft, B.M., Kinde, H., Conrad, P.A., 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.*, 27, 354–361.

Bishop, S., King, J., Windsor, P., Reichel, M.P., Ellis, J., Slapeta, J., 2010. The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. *Vet. Parasitol.*, 170, 137–142.

Buxton, D., Maley S.W., Thomson, K.M., Trees, A.J., Innes, E.A., 1997. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J. Comp Pathol.*, 117, 1–16.

Buxton, D., 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.*, 29, 289–310.

Cavalcante, G.T., Monteiro, R.M., Soares, R.M., Nishi, S.M., Alves Neto, A.F., Esmerini, P.D.O., Sercundes, M.K., Martins, J., Gennari, S.M., 2011. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. *Vet. Parasitol.*, 179, 220–223.

Corbellini, L.G., Driemeier, D., Cruz, C.F.E., Gondim, L.F.P., Wald, V., 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 103, 195–202.

Collantes-Fernández, E., Rodríguez-Bertos, A., Arnaiz-Seco, I., Moreno, B., Aduriz, G., Ortega-Mora, L.M., 2005. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology.*, 65, 629–641.

De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Gasbarre, L., 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.*, 29, 1647–1657.

Dubey, J.P., Dorough, K.R., Jenkins, M.C., Liddell, S., Speer, C.A., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., 1998. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int. J. Parasitol.*, 28, 1293–1304.

Dubey, J.P., Koestner, A., Piper, R.C., 1990. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 197, 857–860.

Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1–59.

Dubey, J.P. et al., 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. *Int. J. Parasitol.*, 32, 929–946.

Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 323–367.

Gondim, L.F.P., Gao, L., McAllister, M.M., 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J. Parasitol.*, 88, 1159–1163.

Goodswen, S. J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T., 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect. Genet. Evol.*, 13, 133–150.

Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., Thür, B., Busato, A., Stärk, K.D.C., Müller, N., 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.*, 28, 679–691.

Ho, M.S., Barr, B.C., Rowe, J.D., Anderson, M.L., Sverlow, K.W., Packham, A., Marsh, A.E., Conrad, P.A., 1997. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J. Parasitol.*, 83:508–514.

Innes, E.A., Wright, S.E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M., Buxton, D., 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, 31, 1523–1534.

Koyama, T., Kobayashi, Y., Omata, Y., Yamada, M., Furuoka, H., Maeda, R., Matsui, T., Saito, A., Mikami, T., 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. *J. Parasitol.*, 87, 1486–1488.

Kritzner, S., Sager, H., Blum, J., Krebber, R., Greif, G., Gottstein, B., 2002. An explorative study to assess the efficacy of toltrazuril-sulfone (ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 18, 1–4.

Malaguti, J.M.A., Cabral, A.D., Abdalla, R.P., Salgueiro, Y.O., Galleti, N.T.C., Okuda, L.H., Cunha, E.M.S., Pituco, E.M., Del Fava, C., 2012. *Neospora caninum* as causative agent of bovine encephalitis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol., Vet.* 21, 48–54.

Mesquita, L.P., Nogueira, C.I., Costa, R.C., Orlando, D.R., Bruhn, F.R.P., Lopes, P.F.R., Nakagaki, K.R.Y., Peconick, A.P., Seixas, J.N., Bezerra Júnior, P.S., Raymundo, D.L., Varaschin, M.S., 2013. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 196, 327–332.

Nishimura, M., Kohara, J., Hiasa, J., Muroi, Y., Yokoyama, N., Kida, K., Xuan, X., Furuoka, H., Nishikawa, Y., 2013. Tissue distribution of *Neospora caninum* in experimentally infected cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, 20, 309–312.

Orlando, D.R., Costa, R.C., Soares, B.A., Oliveira, N.S., Nascimento, L.C., Peconick, A.P., Raymundo, D.L., Varaschin, M.S., 2013. Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.*, 33, 1332–1338.

Peters, M., Lutkefels, E., Heckerroth, A.R., Schares, G., 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.*, 31, 1144–1148.

Rodrigues, A.A.R., Gennari, S.M., Aguiar, D.M., 2004. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Vet. Parasitol.*, 124, 139–150.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463–5467.

Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C.H., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T., 2000. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet. Parasitol.*, 90, 247–252.

Şuteu, O., Pastiu, A., Gyorke, A., Avran, E., Cozma, V., 2013. Molecular detection of *Neospora caninum* in slaughtered goat kids from Romania. *Sci. Parasitol.*, 14, 43–46.

Van Maanen, C., Wouda, W., Schares, G., von Blumroder, D., Conraths, F.J., Norton, R., Williams, D.J.L., Esteban-Redondo, I., Innes, E.A., Mattsson, J.G., Bjorkman, C., Fernández-García, A., Ortega-Mora, L.M., Muller, N., Sager, H., Hemphill, A., 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry

and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet. Parasitol.*, 126, 351–364.

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.

Vonlaufen, N., Guetg, N., Naguleswaran, A., Muller, N., Bjorkman, C., Schares, G., von Blumroeder, D., Ellis, J., Hemphill, A., 2004. In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. *Infect. Immun.*, 72, 576–583.

Weiss, L.M., Ma, Y.F., Halonen, S., McAllister, M.M., Zhang, Y.W., 1999. The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. *Int. J. Parasitol.*, 29, 1713–1723.

Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R., 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol. Today.*, 14, 353–356.

Tabela 1. Músculos avaliados de oito cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, ocorrência de lesão histológica (miosite) e resultado na pesquisa de *N. caninum* por PCR.

Músculos	Cabras												Amostras positivas na PCR (%)				
	A		B		C		D		E		F			G		H	
	Mio site	PCR	Mio site	PCR	Mio site	PCR	Mio site	PCR	Mio site	PCR	Mio site	PCR		Mio site	PCR	Mio site	PCR
Cleido-occipital	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	62,5
Levantador nasolabial	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	50
Zigomático	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Masseter	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	50
Romboide	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	37,5
Esplênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	37,5
Triceps braquial	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	62,5
Serrátil ventral do tórax	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	50
Grande dorsal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	37,5
Intercostal	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	37,5
Omo-hioideo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	50
Supraespinhal	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	25
Infraespinhal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	25
Oblíquo externo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	50
Vasto lateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	50

Continua...

Tabela 1, continuação

Músculos	Cabras												Amostras positivas na PCR (%)												
	A			B			C			D				E			F			G			H		
	Mio site	PCR		Mio site	PCR		Mio site	PCR		Mio site	PCR			Mio site	PCR		Mio site	PCR		Mio site	PCR		Mio site	PCR	
Tensor da fáscia lata	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,5
Semitendíneo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Semimembra náceo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62,5
Diafragma	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Glúteo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
Língua	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
Miocárdio	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25

Tabela 2. Áreas do sistema nervoso avaliadas de oito cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, ocorrência de lesão histológica (manguitos perivascularares e gliose) e resultado na pesquisa de *N. caninum* por PCR.

Área do sistema nervoso	Cabras														Amostras positivas na PCR			
	A		B		C		D		E		F		G			H		
	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR		HE	PCR	
Telencéfalo	MP	+	+															50%
Cerebelo	+																	50%
Tálamo	+		+															50%
Colículo rostral																		
Ponte																		
Óbex																		
ME cervical	+																	62,5%
ME torácica																		37,5%
ME lombar			+															50%
Nervo óptico			+															25%
Gânglio trigeminal																		33,3%

HE= Hematoxilina e eosina; ME= medula espinhal; MP= manguito perivascular;

Tabela 3. Porcentagem de tecidos positivos para *Neospora caninum* por cabra.

Cabra	Total de tecidos	Tecidos positivos na PCR (%)
A	45	24,4
B	46	23,9
C	43	48,8
D	44	56,6
E	45	35,5
F	46	39,1
G	46	54,4
H	44	13,6

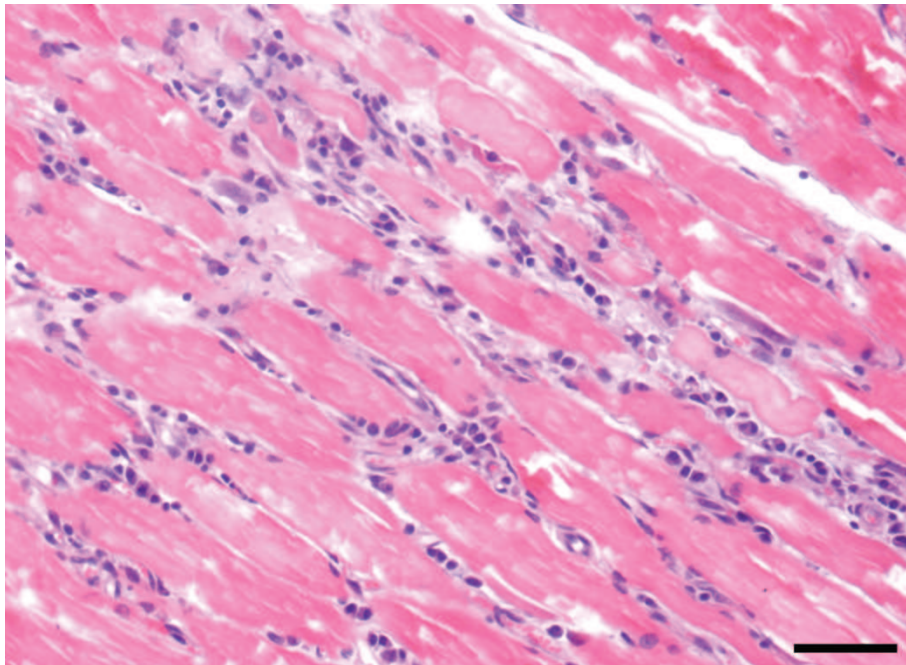


Figura 1– *Neospora caninum* em cabras. Cabra H. Músculo estriado esquelético. Infiltrado inflamatório mononuclear moderado entre miofibras. HE. Barra: 50 μ m

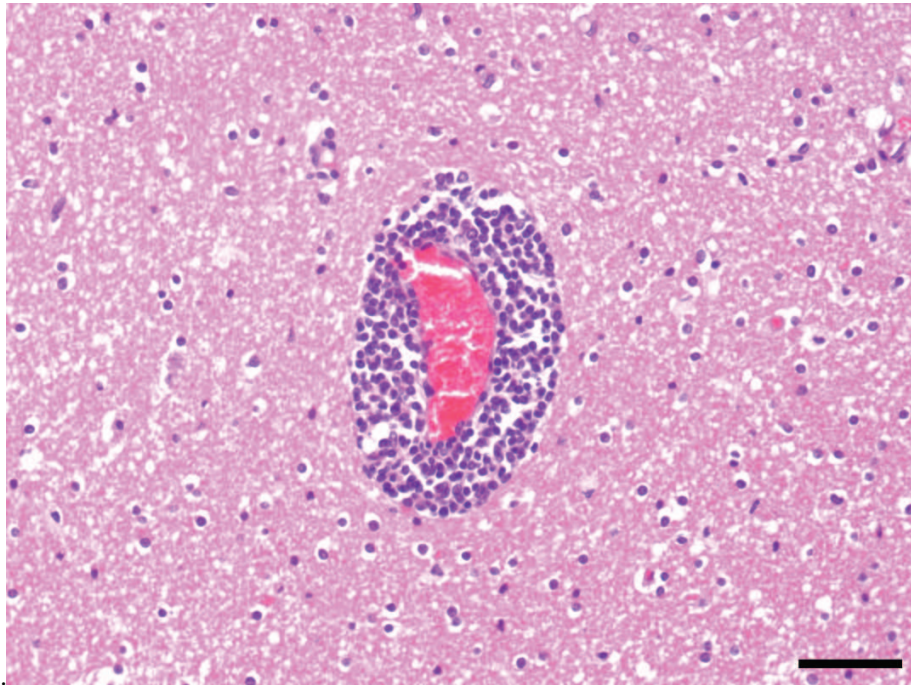


Figura 2 – *Neospora caninum* em cabras. Cabra D. Substância branca do telencéfalo. Manguito perivascular mononuclear acentuado. HE. Barra: 50 μ m.

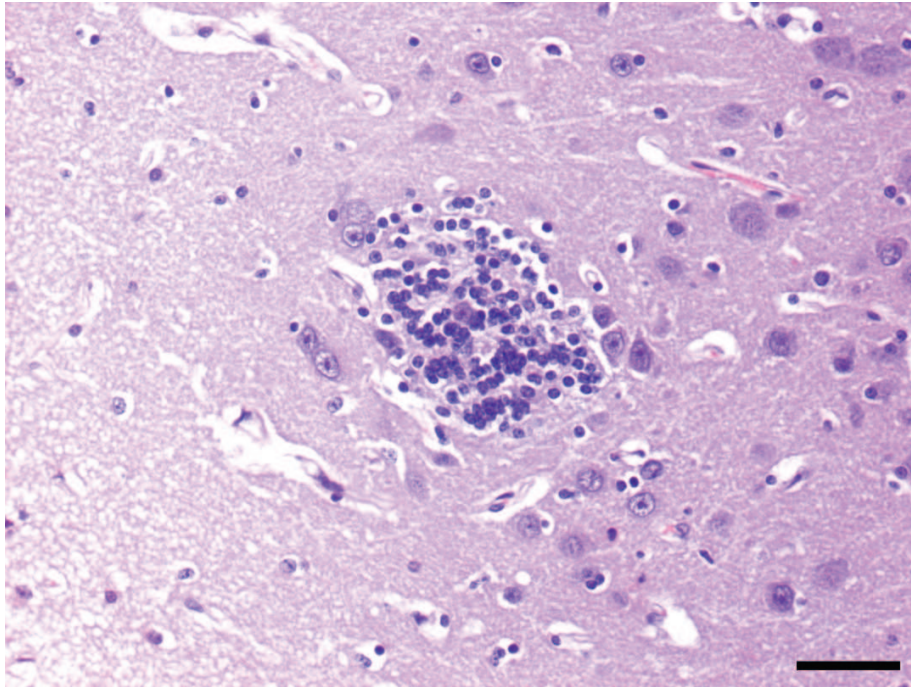


Figura 3- *Neospora caninum* em cabras.Cabra E. Telencéfalo. Gliose focal .HE. Barra: 50 μ m.

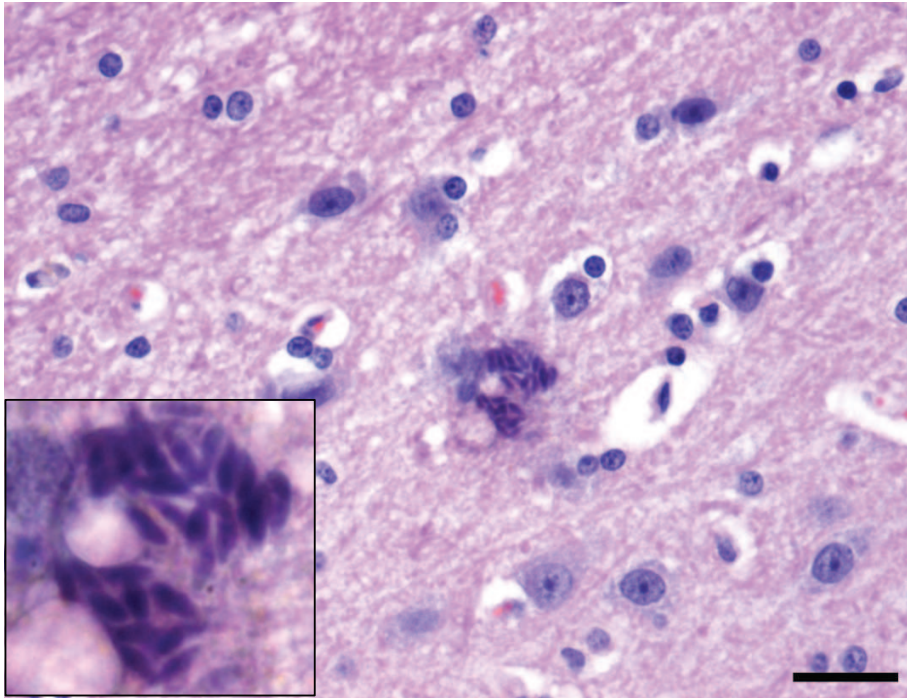


Figura 4– *Neospora caninum* em cabras. Cabra A. Telencéfalo. Coleção de tachizoítos de *N. caninum*. HE. Barra: 25 μ m. No detalhe, tachizoítos em maior aumento. HE

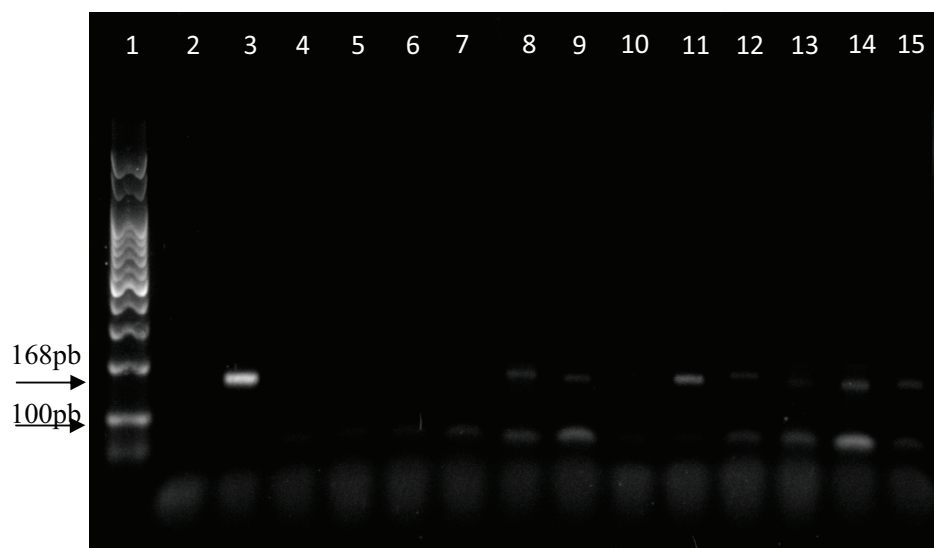


Figura 5- *Neospora caninum* em cabras. Detecção de *Neospora caninum* por PCR. 1: marcador de peso molecular (100pb). 2: controle negativo. 3: controle positivo. 4-15: DNA das amostras de tecidos das cabras.

ANEXO



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 028/13, relativo ao projeto intitulado "Estudo da patogenia e dos locais de latência de Neospora caninum em cabras adultas naturalmente infectadas através de histopatologia, imunoistoquímica e PCR: pesquisa de cistos na musculatura esquelética, cardíaca e SNC.", 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 23/05/2013.


Início do Projeto:23/05/2013 - Término do Projeto:28/02/2014

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 028/13, related to the project entitled "Study of the pathogenesis and latency site of Neospora caninum in naturally infected adult goats by histopathology, immunohistochemistry and PCR: research for cysts in skeletal muscles, heart and CNS.", 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 May 23, 2013.

Project's beginning:23/05/2013 - Project's end:28/02/2014

Lavras, 23 de maio de 2013


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

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