



DOMINGOS SÁVIO DOS SANTOS

**FILOGENIA DE PARTE DA REGIÃO
CODIFICADORA DE rRNAs DE *Neospora*
caninum ISOLADO DE CONCEPTOS
PROVENIENTES DE REBANHOS BOVINO NO
ESTADO DE MINAS GERAIS**

LAVRAS – MG

2010

DOMINGOS SÁVIO DOS SANTOS

**FILOGENIA DE PARTE DA REGIÃO CODIFICADORA DE rRNAs DE
Neospora caninum ISOLADO DE CONCEPTOS PROVENIENTES DE
REBANHOS BOVINO NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

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.

Orientador

Dr. Antonio Marcos Guimarães

Co-orientador

Dr. Christian Hirsch

Co-orientadora

Dr.^a. Mary Suzan Varaschin

LAVRAS – MG

2010

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

Santos, Domingos Sávio dos.

Filogenia de parte da região codificadora de rRNAs de *Neospora caninum* isolado de conceptos provenientes de rebanhos bovino no Estado de Minas Gerais / Domingos Sávio dos Santos. – Lavras: UFLA, 2010.

105 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Antônio Marcos Guimarães.

Bibliografia.

1. PCR. 2. Filogenia. 3. Imunoistoquímica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.089696

DOMINGOS SÁVIO DOS SANTOS

**FILOGENIA DE PARTE DA REGIÃO CODIFICADORA DE rRNAs DE
Neospora caninum ISOLADO DE CONCEPTOS PROVENIENTES DE
REBANHOS BOVINO NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

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 28 de junho de 2010.

Dr. Christian Hirsch UFLA

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA

Dr. Marcelo Fernandes Camargos LANAGRO

Dra. Mary Suzan Varaschin UFLA

Dr. Antonio Marcos Guimarães
Orientador

**LAVRAS – MG
2010**

A Minha mãe Maria do Carmo (in memorian) que me educou e me ensinou a lutar pelos meus sonhos.

Ao Meu pai Sebastião, pelo incentivo e pelas palavras de afeto.

As minhas irmãs:

*Dete, Isabel e Geralda pela força, colaboração e incentivo
Conceição e Mérces pelas palavras de apoio.*

Ao meu cunhado Anderson pela solidariedade.

Aos meus sobrinhos...

Aos meus verdadeiros amigos:

Luiz Fernando e Rafael Silveira.

Enfim,

A minha força de vontade, ousadia, sonhos e amor pela vida...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, sabedoria e paciência...

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV), pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo aporte de recursos.

Ao prof. Dr. Antonio Marcos Guimarães pela orientação, amizade e seus ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Christian Hirsch, pelos ensinamentos, sabedoria, amizade, paciência, companheirismo e pelo longo tempo de dedicação no laboratório, que foram de grande valia para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional.

À prof. Dra. Mary Suzan Varaschin pelos ensinamentos, sabedoria, dedicação, amizade, paciência e pela contribuição no diagnóstico de neosporose bovina.

Ao prof. Dr. Luciano Vilela Paiva pelos recursos oferecidos no LCBM-UFLA.

Ao Dr. Marcelo Fernandes Camargos (LANAGRO) pela atenção e fornecimento de células MDBK para realização deste trabalho.

Aos profs. Dr. Henrique C. P. Figueiredo e Dr. Geraldo M. da Costa pela confiança ao cederem o Lab. de Microbiologia para realização de parte dos meus experimentos.

À prof. Dra. Solange M. Gennari da FMVZ-USP pela doação de células VERO.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao pessoal dos Laboratórios da UFLA, especialmente a Eula, Dirce e Fabrício.

Às meninas da Iniciação Científica que se tornaram verdadeiras amigas durante os momentos mais árduos da pesquisa: Juliana, Michele, Vânia e Raquel.

Aos proprietários rurais pela doação de amostras clínicas.

Aos amigos de Lavras: Zé Mauro, Renata, Glaucia, Tiago, Alessandra, Adriana Garcia, Kity, Ulisses e Stella, que me proporcionaram muitos momentos de descontração.

Aos amigos e família de São João Del Rei que acreditam nos meus sonhos...

À equipe de diretores, coordenadores, professores e alunos do IPTAN e UNIPAC (São João Del Rei), pelo incentivo, colaboração e confiança.

“Quando todos os íntimos não esperavam mais qualquer reação, olhei para tudo o que tinha produzido e acreditei em meu sonho. Refleti sobre as principais descobertas e tive a convicção de que elas poderiam contribuir para a sociedade.”

Augusto Cury

RESUMO

A neosporose constitui, atualmente, uma das principais causas de abortos em bovinos em todo o mundo. A literatura menciona a ocorrência de variação biológica, patogênica e genética entre diferentes isolados de *Neospora caninum*, cujas informações são escassas no Brasil. Desta forma são necessárias pesquisas a respeito de sua genética que poderão esclarecer alguns aspectos sobre a inter-relação parasito-hospedeiro. Este estudo visou analisar filogeneticamente parte da região codificadora de RNAs ribossomais de *N. caninum*, especificamente a região ITS-1, que representa um fragmento gênico sujeito ao polimorfismo e um indicador evolutivo do parasito. Inicialmente foi preciso padronizar uma PCR que tivesse como produto um fragmento de 588 pb e que abrangesse parte da região gênica 5' -18S rDNA - ITS 1 - 5.8S rDNA -3'. A especificidade deste fragmento foi determinada pelo programa BlastN, demonstrando similaridade acima de 90% com dezenas de sequências de *N. caninum* depositadas no Banco Mundial de Genomas (GenBank). Três amostras de conceptos positivas para a PCR foram sequenciadas, editadas, submetidas ao GenBank e alimentadas em programas de bioinformática para a geração de uma árvore filogenética. A árvore mostrou elevada conservação entre as sequências de isolados de *N. caninum* deste estudo e aquelas depositadas no GenBank. Ramos bem definidos e específicos foram gerados ao se alinhar sequências de outros apicomplexas pertencentes à subfamília Toxoplasmatinae. Os resultados da PCR, histopatologia e imunistoquímica comprovaram por meio de diagnóstico direto e efetivo a ocorrência da neosporose em rebanhos bovinos de Minas Gerais.

Palavras-chave: *Neospora caninum*. PCR. Filogenia. Conceptos. Imunistoquímica.

ABSTRACT

The neosporosis is currently a major cause of abortion in cattle worldwide. The literature mentions the occurrence of biological variation, pathogenic and genetic among different isolates of *Neospora caninum*, which information is scarce in Brasil. Thus, are necessary research about their genetic that would explain some aspects of host-parasite interrelationships. This study aimed to analyze phylogenetically part of the coding region of ribosomal RNA of *N. caninum*, specifically the region ITS-1 that represents a gene fragment polymorphism and subject to an evolutionary indicator of the parasite. Initially it was necessary to standardize a PCR product that had as a fragment of 588 pb and covering part of the gene region 5' -18s rDNA - ITS 1 - 5.8s rDNA - 3'. The specificity of this fragment was determined by the BlastN program, demonstrating similarity above 90% with dozens of sequences *N. caninum* deposited in the Genome World Bank (GenBank). Three samples of conceptus positive for PCR were sequenced, edited and submitted to GenBank and fed into bioinformatics programs to generate a phylogenetic tree. The tree showed high conservation among the sequences of isolates of *N. caninum* in this study and those deposited in GenBank. Branches well defined and specific were generated to align sequences of another Apicomplexa belong to the subfamily Toxoplasmatinae. The results of PCR, histopathology and immunohistochemistry confirmed by diagnostic direct and effective the occurrence of neosporosis in cattle herds in Minas Gerais.

Keywords: *Neospora caninum*. PCR. Phylogeny. Conceptus. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i> . Adaptado de DUBEY (2003).....	24
Figura 2	Região do rDNA codificadora de rRNA de <i>N. caninum</i> . Ilustração baseada na sequência depositada no GenBank, L49389 (PAYNE; ELLIS,1996).....	25
Figura 3	Infecção por <i>N. caninum</i> . Feto bovino abortado (animal A). Colículo rostral. Áreas multifocais de infiltrado inflamatório mononuclear associado à gliose (seta). H.E., Obj. 10.....	55
Figura 4	Infecção por <i>N. caninum</i> . Feto bovino abortado (animal A). Colículo caudal. Área focal de necrose associada a infiltrado inflamatório mononuclear e gliose. H.E., Obj. 20.....	55
Figura 5	Infecção por <i>N. caninum</i> . Feto bovino abortado (animal A). Colículo caudal. Encefalite necrosante não supurativa acentuada. H.E., Obj. 20.....	56
Figura 6	Infecção por <i>N. caninum</i> . Feto bovino abortado (animal B). Coração. Miocardite não supurativa multifocal acentuada. H.E., Obj. 20.....	57
Figura 7	Infecção por <i>N. caninum</i> . Feto bovino abortado (animal T). Pericárdio. Pericardite não supurativa difusa acentuada. H.E., Obj. 20.....	57

Figura 8	Infecção por <i>N. caninum</i> . Feto bovino abortado (animal T). Músculo esquelético. Miosite não supurativa multifocal acentuada. H.E., Obj. 20.....	58
Figura 9	Infecção por <i>N. caninum</i> . Feto bovino abortado (animal T). Músculo esquelético. Presença de cisto (seta) na fibra do músculo esquelético. H.E., Obj 40.....	59
Figura 10	Infecção por <i>N. caninum</i> . Feto bovino abortado (animal A). Hepatite necrosante não supurativa acentuada. H.E., Obj. 20.....	60
Figura 11	Infecção por <i>Neospora caninum</i> . Córtex cerebral de feto bovino abortado (animal A). Imunoistoquímica. Método estreptavidina- biotina-peroxidase. Obj. 40.....	61
Figura 12	Infecção por <i>N. caninum</i> . Colículo rostral de feto bovino abortado (animal A). Imunoistoquímica.. Método estreptavidina-biotina- peroxidase. Obj. 40	62
Figura 13	Infecção por <i>Neospora caninum</i> . Músculo esquelético de feto bovino abortado (animal T). Imunoistoquímica. Método estreptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 40.....	63
Figura 14	Imagem da eletroforese aplicada nos produtos da PCR para o gene de β -actina bovina. Canaletas: 1 a 7 – amostras clínicas, 8 – controle positivo, 9 – padrão de tamanho de DNA, 10 – controle negativo; e 11 a 17 outras amostras clínicas.	65

Figura 15	Esquema que ilustra a posição do fragmento de DNA com 588pb, obtido na PCR-RR-NC, situado na posição 4 a 592 dentro da sequência de 1046 nucleotídeos descrita por Payne & Ellis em 1996.....	66
Figura 16	Imagem que ilustra a posição das bandas de DNA geradas após eletroforese dos produtos da PCR-RR-NC. Canaletas: 1 – Controle Positivo; 2 – Controle Tamanho; 3 – Amostra clínica; 4 – Controle Negativo. Imagem em gel de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídeo.....	67
Figura 17	Imagem dos produtos de PCR-RR-NC em amostras clínicas. Canaletas: 1 – Controle Tamanho; 2 – Controle Positivo; 3 – Amostra clínica; 4 – Amostra clínica; 5 – Amostra clínica; 6 – Controle Negativo; 7 – Amostra clínica; 8 – Amostra clínica. Imagem de gel de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídeo.....	68
Figura 18	Representação das sequências de nucleotídeos das amostras 06, 26 e 40, editadas no padrão FASTA. A primeira linha de cada sequência contém o nome da sequência e o número total de nucleotídeos.....	71
Figura 19	Resultado do alinhamento das sequências obtidas neste estudo com a sequência de Payne e Ellis (1996), obtido no programa MultAlin. As bases marcadas pelo programa em cor azul são diferentes da mesma base na sequência de referência e, portanto, caracterizam-se como mutações em relação a esta.....	73
Figura 20	Esquema que ilustra a posição do fragmento de DNA com 346pb,	

obtido na edição para obtenção de sequências do mesmo tamanho. Inicia-se na posição 67 e se estende até a posição 412, dentro da sequência de 1046. Destaca-se o detalhe de que todo o fragmento se encontra dentro de ITS-1..... 74

Figura 21 Relações filogenéticas de 34 sequências de parte da região gênica ITS-1 de protozoários da subfamília Toxoplasmatinae representados pelos parasitos: *N. caninum* (NC), *N. hughesi* (NH), *T. gondii* (TG) e *H. hammondi* (HH). Os nós terminais estão representados pelo nº de acesso ao GenBank e por letras sugestivas de iniciais dos parasitos. As sequências identificadas com HM229410, HM229411 e HM229412 foram obtidas neste estudo, especificamente na região próxima a Lavras - MG, Brasil. As demais foram publicadas por outros autores e estão disponíveis no Banco Mundial de Genomas..... 75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação de depósitos brasileiros da região gênica ITS-1 de <i>N. caninum</i> no GenBank, o local de estudo e seus respectivos autores.....	37
Quadro 2	Relação do nº de amostras clínicas, órgãos equivalentes, idade, sexo e origem do animal.....	43
Quadro 3	Relação de iniciadores empregados neste trabalho, suas respectivas sequências nucleotídicas e referências.....	49
Quadro 4	Resultado dos testes de Histopatologia, PCR e IHQ em amostras clínicas.....	64
Quadro 5	Relação de amostras de tecidos bovinos com resultados da PCR de β -actina bovina e PCR de <i>N. caninum</i>	69
Quadro 6	Relação de sequências submetidas ao Genbank, os respectivos nomes e o número de acesso gerado, Também é apresentada a identificação do animal e sua origem geográfica.....	70
Quadro 7	Relação das mutações observadas nas sequências obtidas neste estudo, em comparação com as demais sequências depositadas no GenBank referentes a parte da região codificadora de rRNA de <i>Neospora caninum</i> . Cada posição de mutação gênica foi baseada na sequência descrita por Payne e Ellis (1996) e gerada pelo alinhamento no programa <i>ClustalW</i> . O número da sequência gênica depositada no GenBank referente a	

mutação..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
F:Cl:Al	Fenol : Clorofórmio: Álcool Isoamílico
HE	Hematoxilina eosina
HCl	Ácido clorídrico
ITS	Interbal transcribed spacer – “espaçador interno transcrito”
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	micrômetro
mM	milimolar
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PCR-RR-	PCR da região codificadora de RNAs ribossomias de <i>Neospora</i>
NC	<i>caninum</i>
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p	quantidade suficiente para
rDNA	Região do DNA codificadora de RNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Dodecil Tris-EDTA
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	<i>Neospora caninum</i>	22
2.1.1	Taxonomia.....	22
2.1.2	Morfologia.....	22
2.1.3	Ciclo biológico	23
2.2	Região codificadora de rRNAs de <i>Neospora caninum</i>	24
2.3	Neosporose bovina.....	26
2.3.1	Sinais clínicos.....	26
2.3.2	Transmissão.....	26
2.2.3	Epidemiologia e distribuição geográfica.....	27
2.2.4	Diagnóstico.....	28
2.3.4.1	Sorológico.....	28
2.3.4.2	Histopatológico.....	29
2.3.4.3	Imunoistoquímico.....	31
2.3.4.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	32
2.4	Filogenia.....	33
2.4.1	Reconstrução filogenética.....	33
2.4.1.1	Neighbor-Joining (NJ).....	34
2.4.2	Mutações gênicas.....	34
2.5	Relação entre genética e doença.....	35

3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	METAS ESPECÍFICAS.....	39
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1	Coleta e processamento do material para histopatologia e IHQ.....	40
5.2	Coleta de material para extração de DNA e PCR.....	42
5.3	Extração de DNA.....	44
5.3.1	Protocolo de extração de DNA de tecido animal baseado no método F:Cl:AI adaptado de Sambrook (1989).....	44
5.3.2	Protocolo de extração de DNA de tecido animal baseado no método F:Cl:AI do Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo - MG (LANAGRO).....	45
5.3.3	Protocolo de extração de tecido animal Invisorb <i>Spin</i> Tissue – INVITEK.....	46
5.4	Cultura de células VERO.....	47
5.5	Obtenção de taquizoítos de <i>N. caninum</i> padrão.....	47
5.6	Quantificação do DNA extraído.....	48
5.7	Padronização da PCR.....	48
5.7.1	Reação em cadeia da polimerase – PCR para verificação da acessibilidade do DNA extraído.....	49
5.7.2	PCR-RR-NC.....	50

5.8	Identificação das bandas.....	50
5.9	Sequenciamento.....	51
5.10	Análise filogenética.....	51
6	RESULTADOS.....	53
6.1	Histórico clínico e achados macroscópicos.....	53
6.2	Achados microscópicos.....	54
6.3	Achados imunoistoquímicos (IHQ).....	60
6.4	Extração de DNA.....	65
6.4.1	PCR β -actina bovina.....	65
6.4.2	PCR-RR-NC.....	66
6.4.3	PCR das amostras clínicas.....	67
6.5	Sequenciamento.....	69
6.6	Filogenia.....	72
7	DISCUSSÃO.....	78
7.1	Achados histopatológicos e imunoistoquímicos.....	78
7.2	Extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	79
7.3	Dados filogenéticos.....	83
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
9	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXOS.....	99

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e rentabilidade da bovinocultura é um desafio para o produtor, devido a fatores que interferem com a produção. Por isso, estratégias que solucionem esses problemas devem ser criadas. Um dos obstáculos a esse desenvolvimento são os problemas sanitários, que elevam o custo de produção e reduzem a competitividade dos produtos gerados. Dentre esses problemas, aqueles que interferem no desempenho reprodutivo do rebanho bovino possuem destaque, devido à forma disseminada e insidiosa que ocorrem e por atingirem diretamente a geração de novos animais. Também provocam importante redução na produção de leite, já que esta depende da gestação para ocorrer adequadamente.

Estudos científicos têm sido realizados na área de sanidade animal com intuito de minimizar os efeitos deletérios provocados por diferentes agentes patogênicos que podem causar expressivos prejuízos econômicos a cadeia produtiva do agronegócio.

A neosporose bovina é uma doença de interesse sanitário causada pelo parasito do filo apicomplexa *Neospora caninum* que causa prejuízos à reprodução de rebanhos leiteiros e de corte. Esta patologia, apesar de ter sido estudada nos últimos anos, ainda requer um melhor conhecimento, principalmente no que diz respeito a sua epidemiologia e genética.

A evolução na área da biologia molecular possibilitou o aperfeiçoamento de metodologias que possam investigar mais detalhadamente as estruturas genéticas do parasito *N. caninum*, que favorecerão estudos epidemiológicos e futuras inferências filogenéticas.

Para melhor caracterização genética de *N. caninum*, este estudo abordou parte da região codificadora de RNAs ribossomais presente no rDNA deste parasito e utilizou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e softwares da

Bioinformática como ferramenta de análise de sequências genéticas adquiridas. Estes dados foram correlacionados com resultados de imunoistoquímica e histopatológicos em tecido cerebral e cardíaco de conceptos bovinos.

Os resultados da padronização da PCR, associados às descrições das lesões histopatológicas e testes imunoistoquímicos, constituem o foco deste estudo e visam contribuir de forma interdisciplinar na ampliação de procedimentos diagnósticos da neosporose bovina, bem como na inferência de informações filogenéticas.

Atualmente, são raras as informações genéticas disponíveis sobre isolados brasileiros de *N. caninum* e, mesmo em nível mundial, estes estudos ainda são-escassos, com pequeno número de depósitos no GenBank em relação a este parasito. Baseado nestes dados, torna-se clara a necessidade de mais estudos nesse sentido, os quais venham a contribuir no conhecimento da taxonomia, patogenia e pontos geográficos do agente da neosporose, que é atualmente considerada uma das mais relevantes doença da reprodução em bovinos de leite e corte de diversos países.

Por este motivo, o presente trabalho propôs a abordagem desta região gênica com vistas à obtenção de dados filogenéticos de amostras de *N. caninum* isoladas de conceptos infectados naturalmente no estado de Minas Gerais, comparando-as entre si e com aquelas disponíveis nos bancos de dados genéticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Neospora caninum*

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório, causador de abortos em bovinos, em vários países (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2004). Foi reconhecido em cães na Noruega em 1984 (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984), posteriormente caracterizado como um novo gênero e espécie *N. caninum* (DUBEY et al., 1988).

2.1.1 Taxonomia

Neospora caninum pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, gênero *Neospora* e espécie *N. caninum* (DUBEY; LINDSAY, 1996; ALVAREZ-GARCIA, 2003).

2.1.2 Morfologia

A morfologia de *N. caninum* pode variar de acordo com o estágio apresentado (DUBEY, 2003).

Taquizoítos são oviformes ou em forma de meia-lua, apresentam tamanho de 3 a 7 μm x 1 a 5 μm e o núcleo pode aparecer na posição central ou terminal. (ANDREOTTI et al., 2003; DUBEY, 2003; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; DUBEY; LINDSAY, 1996).

Bradizoítos são encontrados em cistos, principalmente no sistema nervoso central, apresentam formato fino com multiplicação lenta ou em latência, medem 6 a 8 x 1 a 2 μm , com presença de núcleo terminal ou

subterminal. Os cistos são arredondados ou oviformes e podem medir até 107 μm , onde a espessura da parede pode variar de 1 a 4 μm (ANDREOTTI et al., 2003; DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996).

Oocistos são formas não esporuladas de *N. caninum* que são liberados junto às fezes e apresentam diâmetro entre 10 a 11 μm , com formato redondo. Se tornam infectantes ao se esporularem após três dias no ambiente. Apresentam dois esporocistos, sendo que estes apresentam quatro esporozoítos (DUBEY, 2003; ANDREOTTI et al., 2003).

2.1.3 Ciclo biológico

Parasitas pertencentes à família Sarcocystidae, como *N. caninum*, se caracterizam por terem ciclos biológicos heteroxenos e por formarem cistos no hospedeiro intermediário (ALVAREZ-GARCIA, 2003).

Cães e coiotes são os hospedeiros definitivos (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999; MCALLISTER et al., 1998) responsáveis pela contaminação ambiental ao eliminarem oocistos não esporulados nas fezes após ingestão de cistos teciduais de *N. caninum* em hospedeiros intermediários (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999).

A ingestão de oocistos esporulados por hospedeiros intermediários, como em bovinos, resulta em liberação dos esporozoítos, que após invadirem a célula, irão se transformar em taquizoítos (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). Taquizoítos podem infectar fetos bovinos, por via transplacentária, e causar aborto (DUBEY, 2003).

A invasão e multiplicação dos taquizoítos é rápida e pode causar lesões microscópicas (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; DUBEY, 2003) ao contrário dos bradizoítos que apresentam multiplicação lenta e podem se

transformar em taquizoítos, dependendo do estado imunológico do hospedeiro intermediário (DUBEY, 2003).

O ciclo simplificado do *N. caninum* está representado na Figura 1.

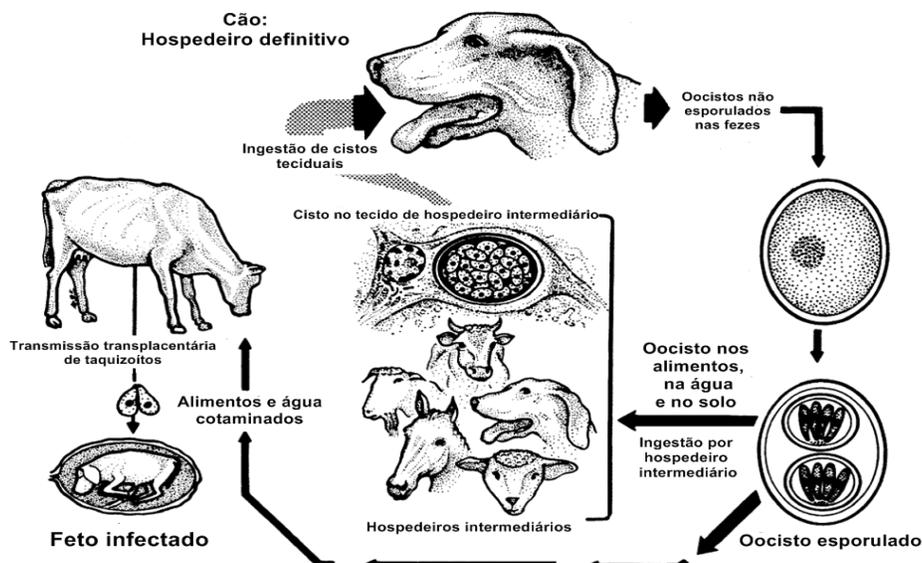


Figura 1 Ciclo de vida de *N. caninum*. Adaptado de DUBEY (2003)

2.2 Região codificadora de RNAs ribossomais de *Neospora caninum*

Os rRNAs (RNAs ribossomais) são elementos necessários na fisiologia celular e exercem interação com as proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos, que são as estruturas responsáveis pela síntese de proteínas (GORAB, 2001).

Segundo Monteiro (2006), a região codificadora de rRNA no genoma de eucariotos, o rDNA, dá origem aos transcritos rRNA que servirão de arcabouço para as subunidades 18S, 5,8S e 28S, que são componentes estruturais dos ribossomos. Este rDNA apresenta segmentos entre as regiões codificadoras dos

rRNAs das subunidades, denominados ITS (*internal transcribed spacer*, ou sequências inter-transcritos). A região ITS-1 está intercalada entre as sequências que codificam para rRNA de 18S e 5,8S.

As regiões ITS apresentam taxa evolutiva superior à subunidades codificadoras de rRNA (OLSEN; WOESE, 1993) e possibilitam estudos de biologia evolutiva (PAYNE; ELLIS, 1996).

A estrutura da região codificadora de rRNA em *N. caninum* foi descrita pela primeira vez, de forma completa, no trabalho de Payne e Ellis (1996). Sua organização encontra-se ilustrada na Figura 2, que representa a sequência gênica 5' -18S rDNA – ITS 1 - 5.8S rDNA – ITS 2 – 28S rDNA - 3'.

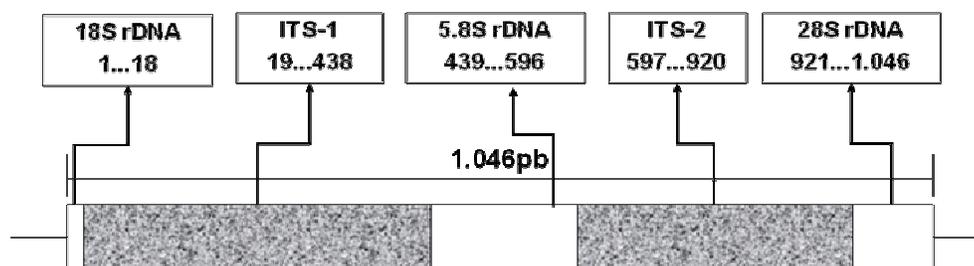


Figura 2 Região do rDNA codificadora de rRNA de *N. caninum*. Ilustração baseada na sequência depositada no GenBank, L49389

Segundo Payne e Ellis (1996), a região ITS é alvo de maior pressão mutagênica evolucionária, apresenta polimorfismo e, por isso, se torna uma sequência eletiva para análises filogenéticas.

Diversos autores utilizaram a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar a região ITS-1 de *N. caninum* em busca de diferentes finalidades. A PCR utilizada por Payne e Ellis (1996), Slapeta et al. (2002) e por Monteiro (2006) foram realizadas para estudos filogenéticos.

2.3 Neosporose bovina

2.3.1 Sinais clínicos

Aborto é o principal sinal clínico da neosporose bovina a partir do terceiro mês de gestação, mas a maioria dos casos ocorre no sexto mês de gestação (DUBEY, 2003).

A morte do feto pode acontecer no próprio útero, ser reabsorvido ou sofrer autólise, pode morrer logo após nascimento ou persistir com a doença (COLLANTES- FERNANDEZ et al., 2006a; DUBEY, 2003; DUBEY, 2005; HALL; REICHEL; ELLIS, 2005; ORTEGA-MORA; FERNANDEZ-GARCIA; GOMEZ-BAUTISTA, 2006).

Os outros sinais clínicos, além dos abortamentos, foram relatados em bezerros com menos de quatro meses de idade, como paralisia, distúrbios neuromusculares, incoordenação, ataxia, exoftalmia ou aparência assimétrica dos olhos e cegueira (DE MEERSCHMAN et al. 2005; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003; ORTEGA-MORA; FERNANDEZ-GARCIA; GOMEZ-BAUTISTA, 2006).

2.3.2 Transmissão

A infecção por *N. caninum* pode acontecer de forma vertical e horizontal (DUBEY, 2003; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2004).

Bovinos podem desenvolver a neosporose ao ingerir água e alimentos contaminados com oocistos (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2004) e cães podem adquirir o parasito ao se alimentarem de tecidos bovinos com presença de cistos de *N. caninum* (MCALLISTER et al., 1998), sendo estas as formas horizontais de disseminação da doença.

A via vertical (transplacentária) é considerada a principal via de transmissão de *N. caninum*, pois pode causar aborto (DUBEY, 2003; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2004). Esta via pode ser exógena, quando a mãe ingere oocistos durante a gestação ou pode ser endógena, quando há uma reativação do parasita em vacas gestantes infectadas cronicamente, provavelmente congenitamente infectadas (ORTEGA-MORA; FERNANDEZ-GARCIA; GOMEZ-BAUTISTA, 2006). A transmissão causada pela via endógena pode causar abortos endêmicos ou esporádicos enquanto a via exógena pode causar abortos epidêmicos (DUBEY; SCHARES, 2006).

Ortega-Mora, Fernandez-Garcia e Gomez-Bautista (2006) apontam a importância de estudos que visem outras vias de transmissão por *N. caninum* como a ingestão de colostro e a transmissão venérea, devido a recentes descoberta de taquizoítos no sêmen de touros.

2.3.3 Epidemiologia e distribuição geográfica

Para compreender a epidemiologia do *N. caninum*, é importante identificar a sua gama de hospedeiros e distribuição geográfica (DUBEY, 2003; DUBEY, 2005).

Bovinos, ovinos, caprinos, bubalinos, canídeos, cervídeos e camelos são naturalmente infectados por *Neospora caninum* (GUIMARÃES JUNIOR; ROMANELLI, 2006).

Segundo Andreotti et al. (2003) os estudos de prevalência de anticorpos contra *N. caninum* são indicativos da distribuição de cães e bovinos infectados por este parasito pelo mundo.

Austrália, Nova Zelândia, Canadá, EUA, Argentina, Costa Rica, Dinamarca, França, África do sul, Portugal, Hungria, México, Alemanha e outros indicam a distribuição mundial de *N. caninum* (DUBEY, 2003).

Moore (2005) destaca a neosporose bovina inclusive na América do sul, representada pelos países Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai.

No Brasil, uma das comprovações da doença foi nos estudos de Ragozo et al. (2003) ao verificar anticorpos anti-*N. Caninum* nos estados Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo.

Em Minas Gerais, estudo realizado por Guedes (2006) mostrou que a infecção por *N. caninum* ocorre de forma endêmica em vacas e fetos provenientes de rebanhos leiteiros na microrregião de Lavras, região Sul do Estado.

2.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico da neosporose bovina baseia-se na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em animais adultos e a visualização de lesões sugestivas no cérebro, coração e fígado de fetos abortados, associados a exames de imunistoquímica, sorologia fetal e PCR (ORTEGA-MORA; FERNANDEZ-GARCIA; GOMEZ-BAUTISTA, 2006).

2.3.4.1 Sorológico

Os exames sorológicos são muito importantes para o diagnóstico e para estudos epidemiológicos da neosporose bovina. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), métodos imunoenzimático (ELISA) e teste de aglutinação direta (NAT) são os métodos utilizados de pesquisa de anticorpos (SILVA et al., 2008).

Alvarez-Garcia (2003) sugere o colostro, o leite, saliva e fluidos vaginais de vacas como outros meios de pesquisa de anticorpos.

2.3.4.2 Histopatológico

A utilização de lesões microscópicas é muito importante no diagnóstico do aborto por *N. caninum*. Os órgãos eleitos para exame histopatológico são Cérebro, coração e fígado (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 1999; PETERS et al., 2001; SILVA, 2004).

Segundo Ortega-Mora, Fernandez-Garcia e Gomez-Bautista, (2006), parasitos podem ser encontrados ao lado de focos de necrose, porém são dificilmente localizados pelos corantes hematoxilina e eosina (H.E.), motivo de utilização de outros métodos de diagnóstico mais específicos.

As lesões histopatológicas produzidas pelo *N. caninum* em várias espécies animais são caracterizadas por infiltrados de células inflamatórias, compostos basicamente por mononucleares, que podem ser encontradas em todos os órgãos dos fetos abortados, principalmente SNC, coração, músculo esquelético e fígado (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY; LINDSAY, 1996), associadas a áreas multifocais de necrose (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; SHIBAHARA et al., 1999).

No sistema nervoso central, a distribuição das lesões são descritas em ordem decrescente de intensidade na substância cinzenta cortical, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo e medula oblonga (HELMAN et al., 1998). Há uma tendência para o córtex ter mais lesões do que a porção média e superior do tronco cerebral. As lesões produzidas no cérebro consistem de encefalite não supurativa, caracterizada por múltiplos focos de infiltrados inflamatórios mononucleares, geralmente ao redor de um centro de necrose, gliose (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY; SCHARES, 2006; HELMAN et al., 1998; MORALES et al., 2001; ORTEGA-MORA; FERNANDEZ-GARCIA; GOMEZ-BAUTISTA, 2006) e manguitos perivasculares multifocais (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY;

SCHARES, 2006; HELMAN et al., 1998). Ocasionalmente pode ocorrer encefalomielite em bezerros congenitamente infectados (BARR et al., 1991).

No coração se observa miocardite não supurativa moderada a acentuada (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY; SCHARES, 2006; HELMAN et al., 1998; PESCADOR et al., 2007) e as lesões hepáticas consistem de infiltrado mononuclear periportal e focos de necrose hepatocelular associado com trombose intrasinusoidal (BARR et al., 1990; DUBEY; SCHARES, 2006).

O músculo esquelético é frequentemente afetado, sendo observado infiltrado mononuclear multifocal (BARR et al., 1990; BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; CORBELLINI et al., 2001; PESCADOR et al., 2007; PETERS et al., 2001). No pulmão pode ocorrer pneumonia não supurativa associada a focos de necrose e este órgão pode ser considerado importante para o diagnóstico, principalmente quando a coleta do encéfalo não for possível devido a autólise (PESCADOR et al., 2007).

Poucas estruturas parasitárias são observadas na coloração de hematoxilina e eosina (H.E.) (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; DUBEY; SCHARES, 2006; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; ORTEGA-MORA; FERNANDEZ-GARCIA; GOMEZ-BAUTISTA, 2006; PESCADOR et al., 2007). Cistos são descritos somente no cérebro, medula espinhal (BARR et al., 1990; DUBEY; BUXTON; WOUDA et al., 1999) e no músculo esquelético (PETERS et al., 2001). Porém, taquizoítos já foram observados em células de diversos órgãos de animais infectados (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY; SCHARES, 2006).

Segundo Collantes-Fernandez et al. (2006b), o tipo de aborto influencia na quantidade de parasito encontrado e no grau da lesão. Nos casos de abortos epidêmicos, os quais ocorrem em rebanhos que não foram previamente expostos ao parasito, um número maior de parasitos infectariam o feto, em função de uma resposta imune ineficiente para controlar sua multiplicação. Já em abortos

endêmicos, os quais ocorrem em bovinos cronicamente infectados, após a reativação de cistos parasitários latentes, e com uma relativa proteção ao parasito, a imunidade da vaca reduziria a invasão parasitária e um número menor de parasitos infectariam o feto. O autor também sugere uma disseminação sistêmica do *N. caninum* em fetos provenientes de abortos epidêmicos, devido ao DNA deste protozoário ter sido frequentemente identificado em mais de um órgão, onde a maior carga parasitária e os graus mais acentuados de lesão foram observados no coração e no fígado. Já nos abortos endêmicos a detecção do DNA e a maior carga parasitária foi mais frequente no encéfalo.

2.3.4.3 Imunoistoquímico

A imunoistoquímica, amplamente utilizada como método de diagnóstico de *N. caninum* nos tecidos, pode chegar a mais de 80% de resultados positivos em marcações no encéfalo de fetos com lesões sugestivas (ANDERSON et al., 1991; CORBELLINI et al., 2002). Outros autores descrevem em fetos com lesões sugestivas uma positividade de 67,4% (MOORE et al., 2002), 61,7% (PESCADOR et al., 2007), 70% (MOORE et al., 2008) e 8.57% (CABRAL et al., 2009).

Esta técnica permite uma melhor visualização das estruturas parasitárias nos tecidos extremamente importante nas fases iniciais e/ou em lesões discretas, como foi descrito por Barr et al. (1990) e Corbellini et al. (2002), onde o último autor visualizou grupos de taquizoítos ao redor de vasos sangüíneos, associados à resposta inflamatória mínima, no encéfalo de dois fetos de quatro meses de idade. Segundo Dubey (2003) a demonstração por imunoistoquímica do *N. caninum* nas lesões é atualmente a melhor evidência para caracterizar a etiologia do aborto.

A imunistoquímica permite uma visualização precoce do parasita nos tecidos, esta é considerada uma das formas de caracterizar a transmissão congênita do *N. caninum*. É descrita como uma técnica de alta especificidade, porém pouco sensível (MAANEN et al., 2004).

Um dos anticorpos mais frequentemente utilizados e com resultados positivos é o anti-*N. caninum*, produzido em cabras (Veterinary Medical Research Development, Pullman, USA) (BASZLER et al., 1999; CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998; LONG; BASZLER, 1996; SHIBAHARA et al., 1999), associado a técnica streptavidina-biotina, que é frequentemente descrita como resultados positivos (CORBELLINI et al., 2002; MAANEN et al., 2004).

Por meio dessa técnica são descritos números variáveis de taquizoítos marcados com o anticorpo anti-*N. caninum*, mais frequentemente no encéfalo e em menor número de casos no miocárdio (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998). Os cistos ocorrem em pouca quantidade no encéfalo e não estão associados às lesões (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998). Em camundongos nude atímico há descrição de taquizoítos em células endoteliais, no estroma do endométrio, no epitélio e restos celulares do oviducto, no ovário, pâncreas, pulmão, encéfalo, estômago, músculo esquelético, intestino, língua, baço, medula espinhal, fígado, rins e coração (SHIBAHARA et al., 1999).

2.3.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a reação que amplifica segmentos de DNA por meio de ciclos repetidos de replicação de DNA *in vitro*. Esta reação utiliza a enzima DNA-Polimerase para síntese de DNA que ocorre na direção 5' para 3' (WATSON et al., 2006).

Desde a descoberta de *N. caninum*, diversos testes para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* foram desenvolvidos. Esta abordagem indireta de identificação das infecções apresenta limitações quanto ao uso no diagnóstico da neosporose, representada por variações de sensibilidade e especificidade, especialmente na investigação da relação aborto bovino – diagnóstico de neosporose (BJORKMAN; UGGLA, 1999; JENKINS et al., 2002).

Da mesma forma, testes clássicos de detecção dos parasitas ou dos cistos nos tecidos, como o exame histopatológico e a imunistoquímica, apresentam vulnerabilidade no aspecto de sensibilidade analítica e diagnóstica, em função da heterogenicidade quantitativa do protozoário, observada entre diferentes amostras clínicas (MAANEN et al., 2004; MEDINA et al., 2006).

Isto demandou o desenvolvimento de técnicas mais acuradas para o diagnóstico, principalmente aquelas que fornecem evidência direta da presença do parasita nos materiais clínicos. A caracterização da presença de sequências específicas de DNA do agente, por meio da padronização da técnica de PCR direcionada para diferentes regiões genômicas de *N. caninum*, tenta suprir esta demanda. O fato de se tratar de técnica diagnóstica direta e com grande sensibilidade analítica intrínseca são as justificativas principais do seu uso neste campo.

2.4 Filogenia

2.4.1 Reconstrução filogenética

Com os avanços da Biologia Molecular, as pesquisas na área de filogenia ampliaram-se e relações de evolução dos seres vivos nos campos da filogenia molecular puderam se expandir (SCHARDT; SINSHEIMER; LANGE, 1998).

A reconstrução filogenética visa estimar relações de ancestralidade para um determinado número de organismos, conhecidos como táxons. Estes, também chamados de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), podem ser representados por qualquer nível taxonômico (MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001).

Segundo os mesmos autores, a árvore filogenética é a forma gráfica representativa de uma história evolutiva de organismos. Esta árvore consiste de pontos (nós) que são ligados por ramos. O nós podem ser terminais, quando representados pelas unidades taxonômicas ou podem ser internos, quando representado pelo ancestral comum.

2.4.1.1 Neighbor-Joining (NJ)

Existem diferentes métodos para reconstrução filogenética com características específicas. Porém, dentre os diferentes métodos existentes, o método Neighbor-Joining destaca-se pelo resultado rápido, claro, eficiente e o torna de eleição, o que é ratificado pelo uso por muitos autores (PRADO, 2001).

O método Neighbor-Joining constrói a topologia de uma árvore e avalia bases de dados extensas juntamente com o princípio da evolução mínima, no qual a árvore com a menor soma total de ramos é procurada, ou seja, um método que identifica pares de elementos mais próximos e minimiza o comprimento total da árvore (SAITOU; NEI, 1987; RZHETSKY; NEI, 1992).

2.4.2 Mutações gênicas

Entre as diferentes estruturas que compõem o DNA estão às bases nitrogenadas. Denominadas: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Unidas por pontes de hidrogênio, as bases nitrogenadas podem se dividir em: as

purinas e pirimidinas. As purinas são compostas por adenina e guanina e as pirimidinas são compostas por citosina e timina (PIERCE, 2004).

Segundo o mesmo autor, mutações podem ocorrer ao longo da sequência gênica e são caracterizadas por substituições de bases, inserções e deleções.

Substituições são de dois tipos: em transição, quando uma purina é substituída por uma purina diferente ou, alternativamente, uma pirimidina é substituída por uma pirimidina diferente e em transversão, quando uma purina é substituída por uma pirimidina ou vice-versa.

Inserções e deleções são importantes mutações de adição e remoção respectivamente, de um ou mais pares de nucleotídeos. As inserções e deleções dentro de sequências que codificam proteínas podem alterar a matriz de leitura (PIERCE, 2004).

2.5 Relação entre genética e doença

Estudos sobre a genética de parasitos são fundamentais para a caracterização de fatores de virulência, etiopatogenia, epidemiologia e evolução, além de contribuir com o entendimento da relação parasito-hospedeiro (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002).

A região codificadora de RNAs ribossomais de *N. caninum* se tornou alvo de estudos genéticos. É uma região onde uma parte apresenta variabilidade entre seus nucleotídeos, correspondente aos ITS, e outra parte altamente conservada, codificadora de rRNAs ribossomais (MONTEIRO, 2006). A autora ressalta a gama de estudos realizados nas regiões 28S, ITS-1 e 28S para a solucionar questões filogenéticas em parasitos da sub-família Toxoplasmatinae.

Atualmente, existem 59 depósitos de sequências da região gênica rRNA de *N. caninum*, um número relativamente pequeno, porém suficiente para estabelecer relações filogenéticas com novas sequências depositadas.

Rojo-Montejo et al. (2009) isolaram uma cepa de *N. caninum* na Espanha, utilizaram a região ITS-1 e os resultados mostraram variações genéticas com outros isolados. Os testes em camundongos mostraram baixa patogenicidade e ausência de DNA do parasito na fase crônica da infecção, que associado a pequena ocorrência de mortalidade neonatal, sugere que a cepa poderia se tornar uma candidata a vacina.

Outro estudo semelhante a este, com a mesma região gênica, foi o de García-Melo et al. (2009), que, ao utilizarem camundongos, observaram baixa patogenicidade de *N. caninum*. Este estudo foi o primeiro realizado na América do Sul a isolar e caracterizar este protozoário de um bezerro infectado, mas clinicamente saudável.

O Quadro 1 apresenta a lista de depósitos das sequências gênicas brasileiras de *N. caninum* referentes à mesma região codificadora de rRNA no GenBank e, observa-se a ausência de depósitos de isolados no Estado de Minas Gerais.

Quadro 1 Relação de depósitos brasileiros da região gênica ITS-1 de *N. caninum* no GenBank, o local de estudo e seus respectivos autores

Nº acesso ao GenBank	Local	Autor/ano
DQ832318.1	SP	Pena et al. (2007)
DQ997619.1	SP	Monteiro et al. (2007)
DQ997618.1	SP	Monteiro et al. (2007)
DQ997620.1	SP	Monteiro et al. (2007)
FJ966047.1	BA	Santos et al. (2010)
FJ966046.1	BA	Santos et al. (2010)
FJ966043.1	BA	Santos et al. (2010)
FJ176222.1	BA	Silva et al. (2009)
FJ966044.1	BA	Santos et al. (2010)
FJ176221.1	BA	Silva et al. (2009)
DQ059067.1	SP	Soares et al.(2006)
GQ160477.1	BA	Gondim et al. (2010a)
GQ160476.1	BA	Gondim et al. (2010b)
FJ966045.1	BA	Santos et al. (2010)
GQ160475.1	BA	Gondim et al. (2010c)
AY259042.1	BA	Gondim et al. (2004b)
AY259043.1	BA	Gondim et al. (2004b)
DQ832318.1	SP	Pena et al. (2007)
DQ997619.1	SP	Monteiro et al. (2007)
DQ997618.1	SP	Monteiro et al. (2007)
DQ997620.1	SP	Monteiro et al. (2007)
FJ966047.1	BA	Santos et al. (2010)
FJ966046.1	BA	Santos et al. (2010)
FJ966043.1	BA	Santos et al. (2010)
FJ176222.1	BA	Silva et al. (2009)
FJ966044.1	BA	Santos et al. (2010)
FJ176221.1	BA	Silva et al. (2009)
DQ059067.1	SP	Soares et al.(2006)
GQ160477.1	BA	Gondim et al. (2010a)
GQ160476.1	BA	Gondim et al. (2010b)
FJ966045.1	BA	Santos et al. (2010)
GQ160475.1	BA	Gondim et al. (2010c)
AY259042.1	BA	Gondim et al. (2004b)
AY259043.1	BA	Gondim et al. (2004b)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar a ocorrência de agrupamento genético de *N. caninum* em bovinos no estado de Minas Gerais, em relação à região gênica codificadora de rRNA.

3.2 Específico

- a) padronizar uma PCR para parte da região codificadora de rRNAs de *N. caninum*;
- b) obter sequências de DNA de parte da região codificadora de rRNA de *N. caninum* de isolados no Estado de Minas Gerais;
- c) propor uma reconstrução filogenética baseada nesta região codificadora de rRNAs ribossomais de *N. caninum*, entre as sequências obtidas neste trabalho com outras já depositadas no GenBank;
- d) analisar a ocorrência de inter-relações entre dados epidemiológicos, patogênicos e os agrupamentos genéticos eventualmente observados.

4 METAS ESPECÍFICAS

- a) extração e purificação de DNA de encéfalo e coração de conceptos bovinos oriundos da região sul de Minas Gerais;
- b) verificação da qualidade do DNA extraído, por meio da aplicação de uma PCR direcionada ao gene da β -actina bovina;
- c) padronização da PCR para amplificação de parte da região gênica codificadora dos RNAs ribossomais de *N. caninum* (denominada PCR-RR-NC);
- d) sequenciar produtos diretos de PCR com vistas a verificar a especificidade da PCR e alimentar as análises filogenéticas.
- e) estabelecer as relações filogenéticas entre as amostras sequenciadas e aquelas disponíveis no GenBank;
- f) verificar a concordância e especificidade entre os métodos de diagnóstico PCR e imunistoquímica com os resultados da histopatologia.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta e processamento do material para histopatologia e IHQ

Dezesseis fetos e oito bezerros com idade variando entre um dia e quatro meses de idade foram encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da UFLA, no período de dezembro de 2007 a dezembro de 2009. Os fetos eram provenientes de propriedades, predominantemente, da região Sul de Minas Gerais, com histórico de aborto. Após identificação, o feto era medido, utilizando-se fita métrica, mensurando o comprimento da coluna vertebral, a partir da articulação atlanto-occipital até o final do sacro, com o objetivo de determinar a idade fetal, conforme recomendado por Roberts (1984) e Barr et al. (1990). A idade também era obtida por meio de registros de cobertura.

Na necropsia, foram coletados vários tecidos para o exame histopatológico, como, sistema nervoso central (córtex dos hemisférios cerebrais, cerebelo, tálamo, colículo rostral, colículo caudal, pedúnculos cerebelares, óbex e medula cervical), coração, músculo esquelético (semitendíneo e semimembranáceo), fígado, pulmão, rim, baço, timo, linfonodos, ovário, testículo, útero e pele da orelha. A placenta, não foi coletada, por esta não ter sido remetida juntamente com os fetos. Estes tecidos foram fixados em formol a 10% tamponado com fosfatos, no pH 7,2, 0,01M. Após a fixação o material foi clivado, incluído em parafina, cortado a cinco micrômetros e corado pela técnica de hematoxilina e eosina (H. E.). A pesquisa do parasito e lesões ocorreu mediante microscopia ótica.

Os tecidos que apresentaram lesões sugestivas de neosporose como lesões necrosantes e infiltrado inflamatório mononuclear, assim como, aumento das células da glia (gliose) no encéfalo foram analisados minuciosamente.

Todos os animais que apresentaram lesões compatíveis ou não com neosporose na coloração dos tecidos pela H.E., foram submetidos à técnica de imunistoquímica com um kit comercial (LSAB+Kit, Peroxidase, Dako Corporation, Carpinteria, USA) que contém anticorpo secundário conjugado com biotina e streptavidina conjugada com peroxidase. Todos os cortes foram marcados com o anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum*, produzido em cabras (VRMD, PULLMAN, USA), segundo técnica imunistoquímica utilizada por Mills (1992) e modificada por Corbellini et al. (2002). A seguir um breve resumo da técnica.

Nos cortes histológicos, tratados com silane após a desparafinização e a reidratação, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com o produto Peroxidase Bloking Reagente (DAKO) por 1 h, seguido da recuperação antigênica através de uma digestão enzimática realizada com tripsina pH 7,8, a 0,1% por 10 minutos a 37°C e posteriormente irradiação em forno microondas de uso doméstico por dois minutos na potência máxima.

Durante essa etapa, as lâminas ficaram imersas em tampão citrato (pH 6,0). O bloqueio das reações inespecíficas ocorreu com leite desnatado a 5%. Posteriormente os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo primário anti-*N. caninum*, com uma diluição em PBS de 1:2200 por 45 minutos e anti-*T. gondii* numa diluição 1:2400 (como diagnóstico diferencial), em câmara úmida a 37°C, seguido da incubação do anticorpo secundário (presente no kit), por 20 min em temperatura ambiente, em câmara úmida e na sequência, incubado com estreptavidina (presente no kit), por 20 minutos em temperatura ambiente em câmara úmida.

Em todas as passagens as lâminas foram lavadas com PBS. As lâminas foram então, incubadas com o cromógeno DAB (3,3 -diaminobenzidina, DAKO) adicionado a um tampão até a reação ficar marrom. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por até 1 min, desidratadas e montadas. No

controle negativo o anticorpo primário foi substituído por soro fetal bovino. Como controle positivo foi utilizado cortes histológicos com lesões e cistos de *N. caninum* de um caso de infecção natural em caprinos (VARASCHIN et al., 2007).

5.2 Coleta de material para extração de DNA e exame de PCR

Durante a necropsia amostras do cérebro (lobo frontal dos hemisférios cerebrais) e coração (ápice), foram coletados separadamente e congelados para serem submetidos à extração de DNA e exame de PCR. A extração de DNA e o exame de PCR foram realizados nos Laboratórios de Virologia e Bacteriologia do DMV/UFLA.

O Quadro 2 apresenta a relação de amostras deste estudo, estão representados por animais, órgão, idade, sexo e local de origem.

Os órgãos eleitos neste estudo foram o encéfalo e coração, que estão numerados de acordo com cada animal.

Quadro 2 Relação do nº de amostras clínicas, órgãos equivalentes, idade, sexo e origem do animal

Animal	Nº	Órgão	Idade	Sexo	Origem
A	01	Coração	Feto (6 meses)	--	Ijací
	02	Encéfalo			
B	03	Coração	Feto (6 meses)	F	Ijací
	04	Encéfalo			
C	05	Coração	Feto (6 meses)	M	Ijací
	06	Encéfalo			
D	07	Coração	Bezerro (1 dia)	M	Lavras
	08	Encéfalo			
E	09	Coração	Feto (5 meses)	--	Ijací
	10	Encéfalo			
F	11	Coração	Bezerro (3 dias)	M	Juiz de Fora
	12	Encéfalo			
G	13	Coração	Bezerro (2 dias)	M	Lavras (UFLA)
	14	Encéfalo			
H	15	Coração	Feto (5 meses)	F	Itumirim
	16	Encéfalo			
I	17	Coração	Feto (8 meses)	M	Perdões
	18	Encéfalo			
J	19	Coração	Feto (5 meses)	F	Bom sucesso
	20	Encéfalo			
K	21	Coração	Feto (7 meses)	F	Lavras
	22	Encéfalo			
L	23	Coração	Feto (5 meses)	F	Lavras
	24	Encéfalo			
M	25	Coração	Bezerro (20 dias)	F	Conc. da B. de Minas
	26	Encéfalo			
N	27	Coração	Feto (8 meses)	M	Lavras
	28	Encéfalo			
O	29	Coração	Bezerro (1-2 semanas)	M	Lavras
	30	Encéfalo			
P	31	Coração	Bezerro (1 dia)	F	Lavras
	32	Encéfalo			
Q	33	Coração	Feto (5 meses)	M	Ijací
	34	Encéfalo			
R	35	Coração	Bezerra (4 meses)	F	Ijací
	36	Encéfalo			
S	37	Coração	Feto (7-8meses)	M	Itumirim
	38	Encéfalo			
T	39	Coração	Feto (4 meses)	--	Ijací
	40	Encéfalo			
U	41	Coração	Bezerra (1 mês)	F	Lavras
	42	Encéfalo			
V	43	Coração	Feto (7 meses)	F	--
	44	Encéfalo			

W	45	Coração	Feto (5 meses)	M	BambuÍ
	46	Encéfalo			
X	47	Coração	Feto (5 meses)	F	Ritápolis
	48	Encéfalo			

5.3 Extração de DNA

Para obtenção das amostras de DNA foram utilizados três protocolos diferentes. Dois baseados no método fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (F:A:AI) e um que utilizou o kit de extração de DNA genômico tecidual, comercializado pela empresa UNISCIENE (Invisorb *Spin* Tissue Mini Kit, Invitex, Alemanha) baseado na afinidade do DNA pela sílica. Os três protocolos utilizaram a enzima proteinase K para a digestão do tecido.

5.3.1 Protocolo de extração de DNA de tecido animal baseado no método F:Cl:AI adaptado de Sambrook (1989)

Adicionou-se aos 800mg de tecido 8,0 ml de tampão de lise (10mM de tris HCl pH 8,0; 0,1M de EDTA pH 8,0 e 0,5% peso/volume de SDS) na proporção de 10 x o volume de tecido e após macerado o tecido, o material foi transferido para tubos falcon e incubados a 37°C por 1 h. Foi adicionado a Proteínase K (1,0mg/ml) até a concentração final de 100µg/ml, homogeneizou-se gentilmente e incubou a 50°C por 3 h, misturando a solução de tempos em tempos. Posteriormente, o material foi esfriado a temperatura ambiente e adicionou-se para purificação, a solução de Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1 ou 50%-48%-2%). Após homogeneizar bem no vórtex até a mistura ficar com aspecto leitoso, o material foi incubado a 56°C por 30'. Após o período de incubação, o material foi aliquoteado em microtubos eppendorf em volumes iguais e adotou-se o protocolo de extração de DNA de cultura de

células adaptado do Laboratório de Microrganismos Intracelulares do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LABMIC/ICB/UFMG). O material foi centrifugado a 14.000 g por 5' a 4°C, para separar bem as três fases: superior, intermediária e precipitada. Após centrifugar, foi coletada a fase aquosa (superior) e transferida para um novo microtubo eppendorf de 1,5ml onde foi adicionado clorofórmio gelado na proporção de 1:1 e homogenizado no vórtex. Repetidos os passos de centrifugação e coleta, foi adicionado ao DNA, 10% do volume de acetato de sódio 3M, com pH ajustado para 5,8, mais 2,5 vezes o volume da amostra de etanol PA, 96% a 100%. A partir deste momento, o material foi homogeneizado por inversão e colocado a -20°C (freezer) *overnight*, para precipitação do DNA. Após precipitação, os DNAs foram centrifugados a 14.000 g por 30', a 4°C para formar o pellet do DNA. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e deixou os tubos por inversão para tirar todo o etanol. Após estas etapas, foi realizado a eluição do DNA em 50µl de água ultra-pura, estéril e estocados no freezer - 20°C.

5.3.2 Protocolo de extração de DNA de tecido animal baseado no método F:Cl:AI do Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo - MG (LANAGRO)

Após macerar 800mg de tecido, este lavado com 5ml de STE (10mM de Tris HCl pH 8,0; 10mM de NaCl; 1 mM de EDTA), 1,5 ml de SDS 20% e 150 µl de proteinase K. As suspensões foram transferidas para tubos falcon 15 ml e incubadas em 50°C/*overnight*. A extração por F:Cl:AI (25:24:1) foi realizada uma vez. As soluções foram mantidas em frascos âmbar a 4°C. O conteúdo do tubo foi misturado até formar uma emulsão ao agitar no vórtex (três ciclos até atingir consistência leitosa). Foi centrifugado por 5' a 14.000 g e depois colhida

a fase aquosa superior com ponteira cortada na ponta para não danificar o DNA. Na fase aquosa, obtida após a última lavagem com CI, foi acrescentada solução de acetato de sódio 3M (10% do volume) e após acrescentar etanol absoluto (2,5 vezes o volume), foi incubado por -20°C *overnigth*. Após precipitação, os DNAs foram centrifugados a 14.000 g por 30', a 4°C para formar o pellet do DNA. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e deixou os tubos por inversão para tirar todo o etanol. Após estas etapas, foi realizado a eluição do DNA em 50µl de água ultra-pura, estéril e estocados no freezer -20°C.

5.3.3 Protocolo de extração de tecido animal Invisorb *Spin* Tissue – INVITEK

Após pesado 40mg de tecido e fragmentá-lo com gral e pistilo, foi adicionado 400 µl de tampão de lise Lysis Buffer G e 40µl de proteinase K previamente diluída. Misturou-se gentilmente durante dez segundos e transferiu para um tubo tipo eppendorf de 1,5ml. Foi incubado a 52°C *overnigth* em banho-maria e depois centrifugado por dois minutos em velocidade máxima da centrífuga para peletar. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de um 1,5ml e adicionado 200µl de tampão de ligação Binding Buffer T, foi misturado a seguir com vórtex durante 10 segundos. Um filtro *spin* foi colocado dentro de um tubo recipiente de 2ml, o material lisado foi transferido para o filtro e encubado a temperatura ambiente por 1 minuto. Foi centrifugado por dois minutos com a tampa do tubo fechada a velocidade 10.000 g e novamente foi descartado o filtrado. Após o descarte, foi adicionado 550µl do tampão de lavagem Wash Buffer dentro do filtro onde foi centrifugado por um minuto a 10.000 g e novamente descartado o filtrado. Novamente repetiu-se o passo a partir da adição dos 550µl do tampão de lavagem. No mesmo tubo recipiente descartou-se o filtrado e centrifugou mais uma vez a dois minutos por 10.000 g

para a remoção do etanol do tampão de lavagem. O filtro foi colocado com o DNA em novo tubo de 1,5ml e adicionado 100µl de tampão de eluição Elution Buffer D pré-aquecido em 52°C. Após eluição foi incubado durante 3 minutos e centrifugado por 2 minutos a 10.000 g. O filtrado foi estocado a -20°C e o filtro *spin* foi descartado.

5.4 Cultura de células VERO

Células VERO, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias I do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – VPS da FMVZ/USP, foram cultivadas em garrafas com 25cm² de área até a obtenção de 80% de confluência de monocamada. As células foram incubadas em estufas de CO₂ a 37°C e receberam meio de cultura RPMI (Sigma), preparado segundo instruções do fabricante e acrescido de 5% de soro fetal bovino (Invitrogen) e penicilina/streptomicina como inibidores de eventuais contaminantes. A viabilidade das células VERO foi monitorada pela coloração de Azul de Tripán 0,04% diluído em PBS, conforme descrito por Hemphill, Gottstein e Kaufmann, (1996).

5.5 Obtenção de taquizoítos de *N. caninum* padrão

Para a produção de antígenos e DNA de *N. caninum*, realizou-se o cultivo de taquizoítos do parasita em cultura de células Vero preparadas em garrafas com área de 25cm². A monocamada de células VERO, com 80% de confluência, foi inoculada com taquizoítos de *N. caninum* (amostra padrão NC-1), também gentilmente cedida pelo Laboratório de Doenças Parasitárias I do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – VPS da FMVZ/USP. A cultura foi preparada em meio RPMI (Sigma) sem soro fetal bovino e com

penicilina/streptomicina, mantida em ambiente de 5% de CO₂ e umidade saturada por um período variável entre três a cinco dias, até a ruptura completa da monocamada.

5.6 Quantificação do DNA extraído

Todas as amostras de DNA obtidas no laboratório foram avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro; procedimento gentilmente realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA. As diluições das amostras de DNA foram preparadas com água ultra-pura e a relação entre a quantidade de DNA e de proteína DO₂₆₀/DO₂₈₀ foi usada como parâmetro para avaliação da qualidade do DNA.

5.7 Padronização da PCR

Todas as reações foram padronizadas para volumes finais de 20µl e ajustadas proporcionalmente quando foram empregados volumes maiores. Os reagentes das PCR, excetuando-se a água, foram do kit “PCR Core System I” (PROMEGA Corporation, EUA). As reações foram padronizadas mediante experimentação em relação às concentrações de MgCl₂ e temperatura de alinhamento dos iniciadores, referentes a dados disponíveis na literatura ou fornecidos pelos programas de seleção de iniciadores. O Quadro 3 apresenta os iniciadores utilizados neste estudo, seguidos de suas sequências e referências.

Todas as PCR foram realizadas em termociclador PT100 (MJ Research Incorporated, EUA), programado da seguinte maneira: 95°C por cinco minutos – 1 ciclo, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (abertura das fitas de DNA), tempo/temperatura de alinhamento dos iniciadores variável e definido

por experimentação e 72°C por um minuto para extensão, terminando com um período de extensão final de 72°C por sete minutos e 4°C até a retirada.

Quadro 3 Relação de iniciadores empregados neste trabalho, suas respectivas sequências nucleotídicas e referências

Iniciadores	Sequências	Referência
BACTBOV F (Senso) BACTBOV R (Anti-senso)	5'-TCACCCACACGGTGCCCATCTATGA-3' 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCGATGG-3'	LABMIC do ICB/UFMG
Lav 1 (Senso) Tim 11 (Anti-senso)	5'-CGGAAGGATCATTACACACG-3' 5'-CCCACTGAAACAGACGTACC-3'	Este estudo Payne e Ellis (1996)

O Iniciador Lav1 foi selecionado com o auxílio do programa “Primer3”, a partir da sequência depositada por Payne e Ellis (1996) número de acesso no GenBank L49389.

5.7.1 Reação em cadeia da polimerase – PCR para verificação da acessibilidade do DNA extraído

Antes de proceder aos ensaios da PCR-RR-NC, a acessibilidade do DNA em sistemas de PCR foi testada ao utilizar como alvo o gene da β -actina bovina, existente em duas cópias no genoma da espécie bovina. Esta PCR foi desenvolvida no Laboratório de Microorganismos Intracelulares – LABMIC do ICB/UFMG, com vistas à amplificação de uma porção de 295pb do gene da β -

actina (acesso Genbank: AY141970). Os iniciadores empregados foram sintetizados na escala de 50 nanomoles (Invitrogen, Brasil), diluídos posteriormente para a concentração de 100 picomoles como solução estoque e utilizados 20 picomoles, por reação, de cada um. As condições definidas de PCR foram $MgCl_2$ com valor de 3,0mM, temperatura de alinhamento em 65°C durante 30 segundos e uma quantidade de 2 μ l de iniciadores por reação para um volume final de 20 μ l.

5.7.2 PCR-RR-NC

A PCR-RR-NC foi baseada, em parte, no protocolo de Payne e Ellis (1996), projetada para amplificar a porção ITS-1 do genoma de *N. caninum*. A condição definida de PCR foi a concentração de $MgCl_2$ em 1,5 mM, temperatura de alinhamento a 49°C durante 30 segundos. A quantidade de Taq DNA polimerase foi de 0,1 μ l e de DNA template foi 2,0 μ l. A concentração de iniciadores por reação foi de 1 picomole/microlitro, ajustada para um volume final de 20 μ l.

5.8 Identificação das bandas

Para identificar as bandas, o produto de cada PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, na presença de solução tampão de corrida TAE 1X (Tris 40mM, Ac. Acético 20mM, EDTA 1mM) diluído a solução estoque 50x em água Ultra-pura, durante 1h a 100V. A caracterização das bandas de DNA foi obtida pela imersão do gel de agarose em solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) por 30 min e as imagens foram capturadas em fotodigitalizador (transluminação com luz UV), para posterior edição e análises.

5.9 Sequenciamento

O produto de PCR obtido na PCR-RR-NC foi submetido a análise de sequenciamento para posterior confirmação da especificidade. Para tanto o produto foi submetido a purificação onde se aplicou o kit “ GenElute PCR Clean-Up (Sigma), a partir de reações com 50 microlitros. O processo de sequenciamento foi baseado no método de terminação em cadeia por Dideoxi descrito por Sanger et al. (1977).

O sequenciamento de DNA foi executado no LCBM-UFLA. As seqüências recebidas na forma de arquivo gráfico cromatograma foram abertas com o auxílio do programa *Chromas* (Technelysium Pty, Austrália) e exportadas para arquivos do Bloco de Notas (Microsoft, EUA). A confirmação da especificidade das seqüências obtidas foi confirmada com o auxílio do programa BlastN (ALTSCHUL et al., 1990), disponível no sítio do National Institute of Health - NCBI (2010).

Todas as amostras foram sequenciadas em duplicata, nas cadeias senso e anti-senso e comparadas entre si e com a amostra de referencia (nº L49389) para a remoção das ambiguidades e erros de sequenciamento, tanto na análise direta do cromatograma, quanto por meio de alinhamento no programa *MultAlin* (2010).

5.10 Análise filogenética

Após editadas as seqüências para remoção das ambiguidades e para obtenção dos consensos de mesmo tamanho, as análises filogenéticas foram realizadas com auxílio do programa MEGA4. Para tanto as seqüências foram alinhadas programa *ClustalW*, que gerou o arquivo de dados que alimentou o

programa MEGA4. As árvores filogenéticas foram obtidas pelo método Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1.000 replicatas.

O Anexo C apresenta as sequências gênicas de *N. caninum* referentes a região codificadora de rRNA, atualmente disponíveis no GenBank, que se alinharam com as sequências consenso obtidas no presente trabalho. Somente as sequências que se alinharam foram selecionadas. Outro parâmetro que se utilizou para escolha das sequências foi à origem, de forma representar diversas localidades geográficas e proporcionar um universo amostral o mais abrangente possível. Na análise da origem e alinhamento foram excluídas aquelas que se mostraram redundantes, ou seja, eram da mesma origem (geográfica e de autor) e não apresentavam diferenças genéticas em relação às demais do mesmo autor. Todas foram editadas para apresentarem o mesmo tamanho. Após alinhamento no programa *ClustalW*, as sequências alimentaram o programa MEGA4, que fez as análises para geração da árvore filogenética pelo método Neighbor-Joining.

6 RESULTADOS

6.1 Histórico clínico e achados macroscópicos

Num período de dois anos, entre dezembro de 2007 a dezembro de 2009, dezessete fetos e sete bezerras foram enviados ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Destes 24 bovinos, oito apresentaram lesões microscópicas sugestivas de infecção por protozoário, entre os quais *N. caninum*. Foram consideradas como lesões sugestivas a presença de infiltrado inflamatório mononuclear associados ou não a necrose em vários tecidos, e no sistema nervoso central (SNC) considerou-se ainda a presença de gliose (Quadro 4).

Entre os conceptos bovinos com lesões sugestivas de neosporose, seis eram fetos entre quatro a oito meses de idade e duas bezerras, uma com vinte dias e a outra com quatro meses de vida (Quadro 4).

Macroscopicamente não foram observadas lesões significativas nos conceptos com lesões microscópicas sugestivas de neosporose, porém dois destes apresentaram edema de subcutâneo, líquido avermelhado na cavidade abdominal e torácica. Quando comparado ao aspecto macroscópico do encéfalo dos animais amostrados, sabendo-se que o encéfalo de fetos apresenta uma consistência mais friável que os demais animais, três fetos apresentaram a consistência do encéfalo líquida, decompondo-se em vários pedaços ao toque (Animal I) e outro semi-líquida (Animal B e Animal Q). A bezerra de 20 dias (Animal M) foi sacrificada por ser proveniente de um rebanho com aproximadamente 100% de positividade para *N. caninum* e problemas reprodutivos significativos, além do animal apresentar-se pequeno para a idade, possuir uma hérnia umbilical e claudicar da perna direita. O animal de quatro

meses (Animal R) morreu em função de uma dilatação e necrose de abomaso com peritonite secundária.

6.2 Achados microscópicos

As lesões microscópicas, sugestivas de neosporose, foram encontradas principalmente no encéfalo e coração, seguido do músculo esquelético e fígado.

No SNC as lesões histológicas foram encontradas por todo o encéfalo e em um animal no cordão medular. No córtex cerebral foi observado encefalite não supurativa caracterizada por manguitos perivasculares mononucleares (animais A e C), necrose tecidual, facilmente visualizada por eosinofilia tecidual (animal B) e gliose (animais B, A, C, R e T). Em apenas um animal foi observado meningite não supurativa discreta (animal A).

No tálamo e tronco cerebral (óbex, pedúnculos cerebelares, colículo rostral, colículo caudal) representados pela Figuras 3, 4 e 5, foram observadas áreas multifocais de necrose do parênquima, caracterizada por acidofilia do tecido (animais A, B, C e T) e picnose celular (C) associado a infiltrado inflamatório mononuclear, onde em alguns pontos as células mononucleares circundavam os focos de necrose (animais A e C). Também, frequentemente, foi observado gliose multifocal moderada a acentuada (animais A, B, C, M, Q, R e T), muitas vezes, próximas a vasos ou aos focos de necrose e raros manguitos perivasculares (animais M e T).

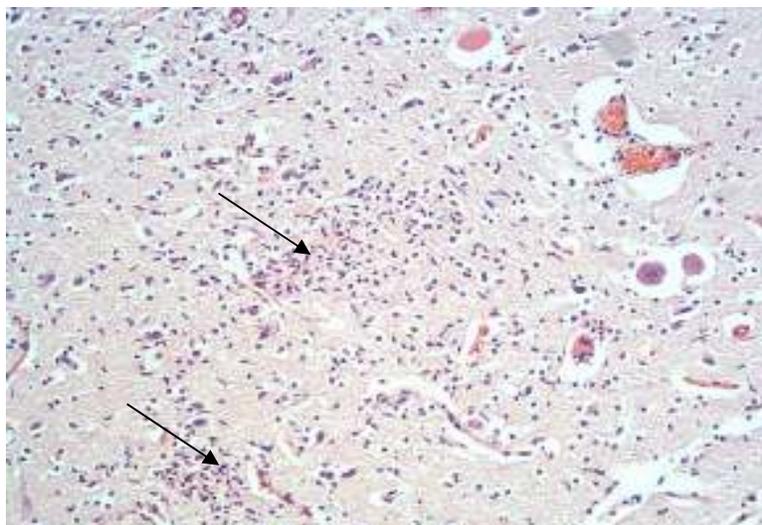


Figura 3 Infecção por *N. caninum*. Feto bovino abortado (animal A). Colículo rostral. Áreas multifocais de infiltrado inflamatório mononuclear associado a gliose (seta). H.E., Obj. 10

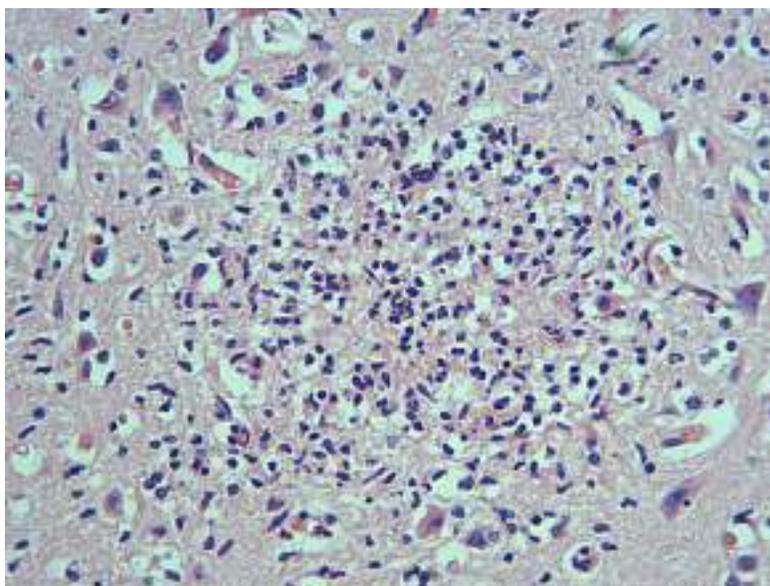


Figura 4 Infecção por *N. caninum*. Feto bovino abortado (animal A). Colículo caudal. Área focal de necrose associada a infiltrado inflamatório mononuclear e gliose. H.E., Obj. 20

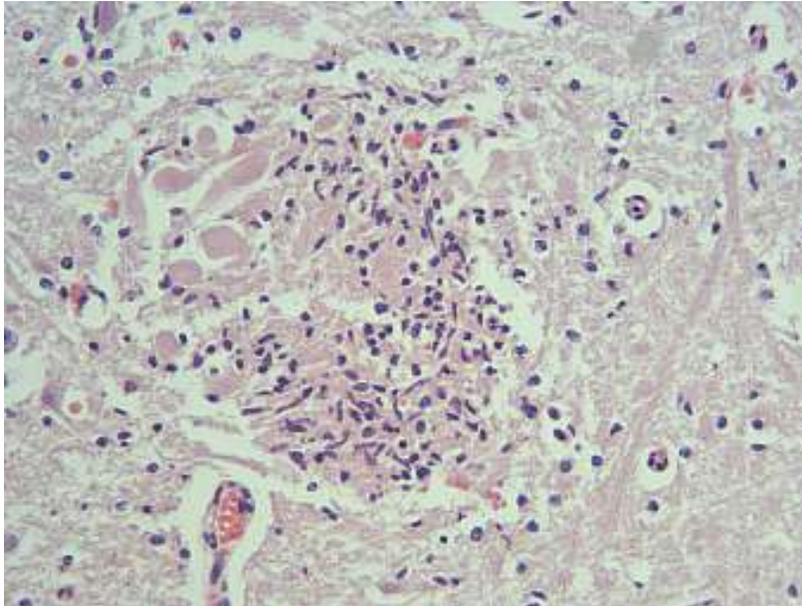


Figura 5 Infecção por *N. caninum*. Feto bovino abortado (animal A). Colículo caudal. Encefalite necrosante não-supurativa acentuada. H.E., Obj. 20

No cerebelo foi observado gliose (animais A, B e T) e necrose tecidual (animais A, B e T), com células mononucleares circundando a área de necrose (animal A), assim como, mangitos perivascularares discretos (animais A e T).

Somente em um animal foi observado um foco discreto de infiltrado inflamatório na substância cinzenta do cordão medular (animal R).

No coração uma miocardite não supurativa caracterizada por áreas multifocais com discreto a acentuado infiltrado inflamatório mononuclear foi observada em todos os fetos e nas duas bezerras. Somente um feto apresentou também uma pericardite não supurativa moderada (animal T) representado pela Figuras 6 e 7.

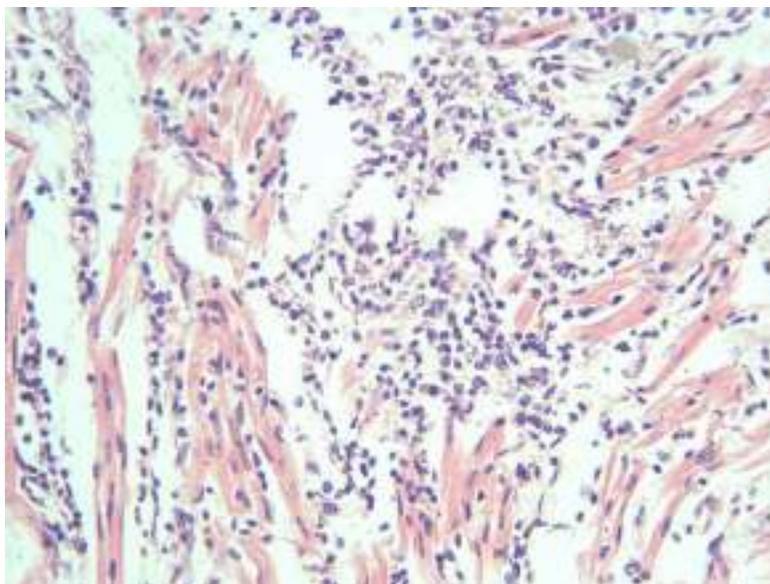


Figura 6 Infecção por *N. caninum*. Feto bovino abortado (animal B). Coração. Miocardite não-supurativa multifocal acentuada. H.E., Obj. 20

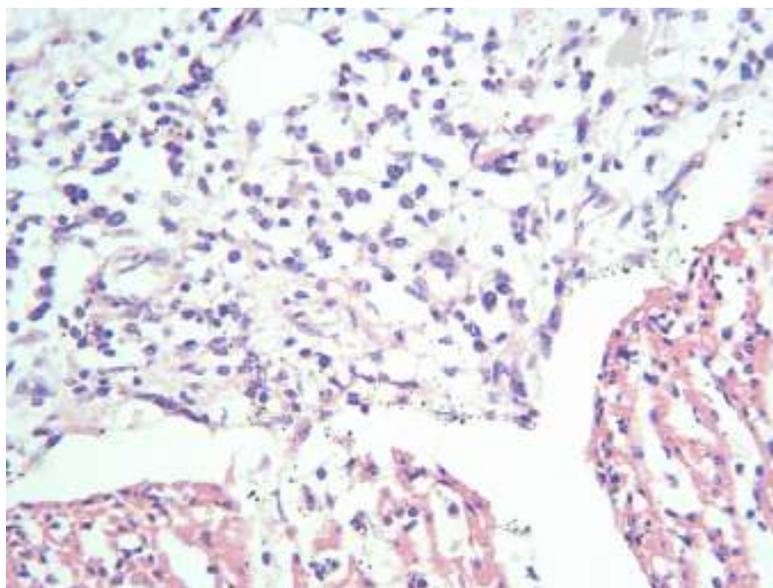


Figura 7 Infecção por *N. caninum*. Feto bovino abortado (animal T). Pericárdio. Pericardite não-supurativa difusa acentuada. H.E., Obj. 20

No músculo esquelético foram observadas áreas multifocais de miosite não supurativa discreta (animais Q e C) a acentuada (animal T) representada pela Figura 8, caracterizada por infiltrado inflamatório mononuclear nas fibras e entre as fibras musculares. Em um animal (animal T) observou-se um cisto com parede fina (cisto jovem) na fibra muscular próximo ao infiltrado mononuclear acentuado representado pela Figura 9.

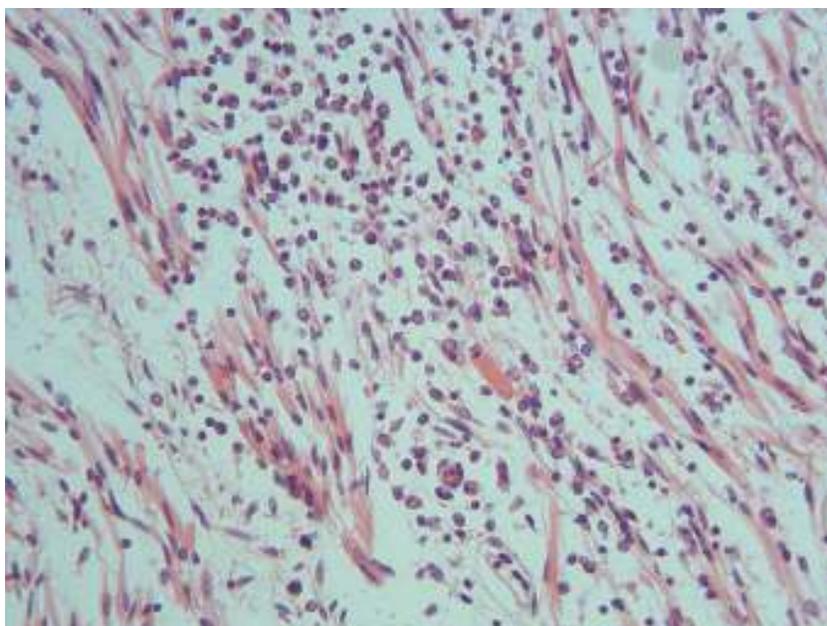


Figura 8 Infecção por *N. caninum*. Feto bovino abortado (animal T). Músculo esquelético. Miosite não-supurativa multifocal acentuada. H.E., Obj. 20

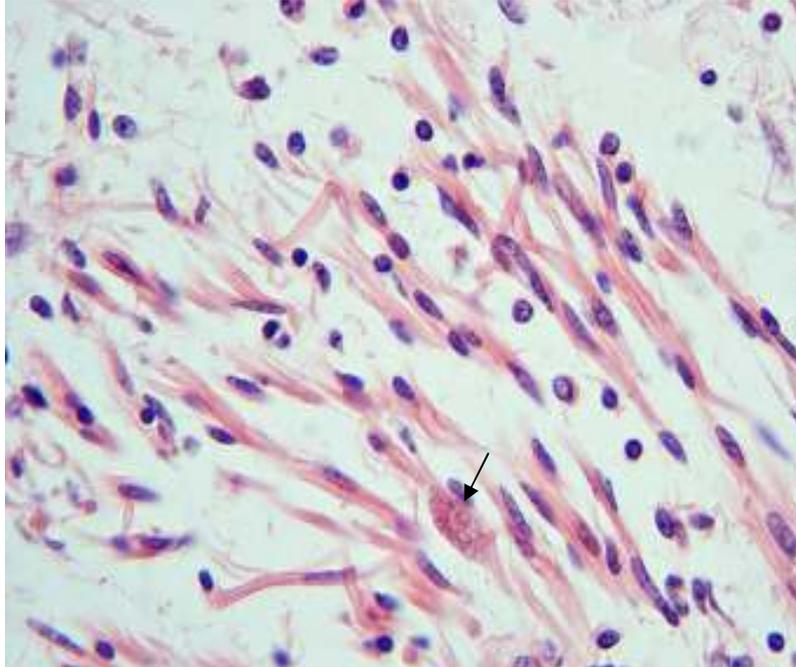


Figura 9 Infecção por *N. caninum*. Feto bovino abortado (animal T). Músculo esquelético. Presença de cisto (seta) na fibra do músculo esquelético. H.E., Obj 40

No fígado, foram encontradas áreas multifocais de necrose (animal A) representada pela Figura 10 e infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta (animais A e T).

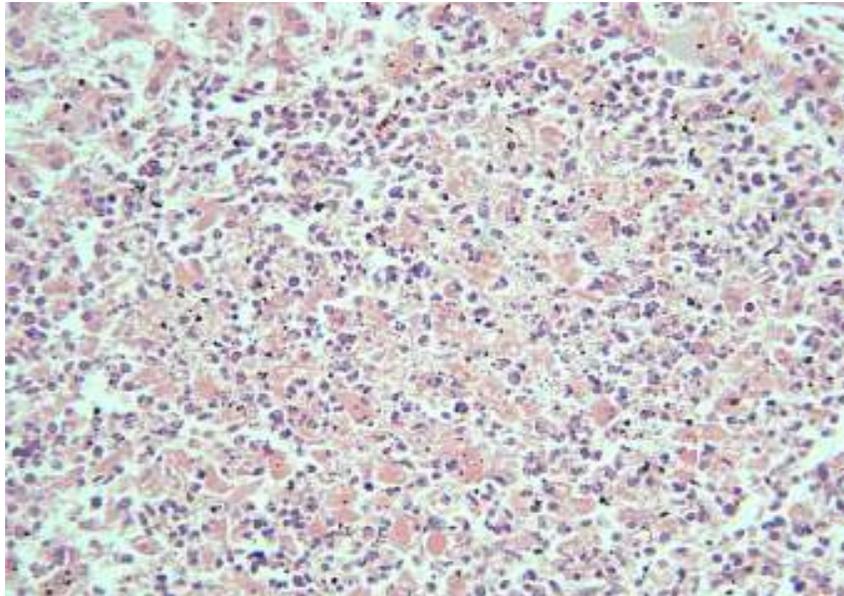


Figura 10 Infecção por *N. caninum*. Feto bovino abortado (animal A). Hepatite necrosante não-supurativa acentuada. H.E., Obj. 20

6.3 Achados imunoistoquímicos (IHQ)

A marcação imunoistoquímica para *N. caninum* foi positiva em três fetos entre as amostras (3/8) que apresentaram lesões sugestivas de aborto ou infecção por protozoário, o que resultou numa positividade de 37,5%. Os fetos com marcação positiva tinham entre quatro a seis meses de idade. Por meio da IHQ visualizaram-se poucos cistos e taquizoítos, predominantes no cérebro dos três fetos. Em um único feto a marcação imunoistoquímica também ocorreu no músculo esquelético.

Na região cortical dos hemisférios cerebrais (Figura 11), próximo a focos de gliose e infiltrado mononuclear perivascular, observou-se a presença de cisto (animal A) e taquizoítos (animais A e T). No colículo rostral (Figura 12)

verificou-se a presença de cisto (animal Q) e grupos de taquizoítos próximos as áreas de necrose e gliose (animais A e Q). Taquizoítos também foram visualizados no pedúnculo cerebelar (animal T). Em todas as marcações os taquizoítos tenderam a apresentar um formato arredondado.

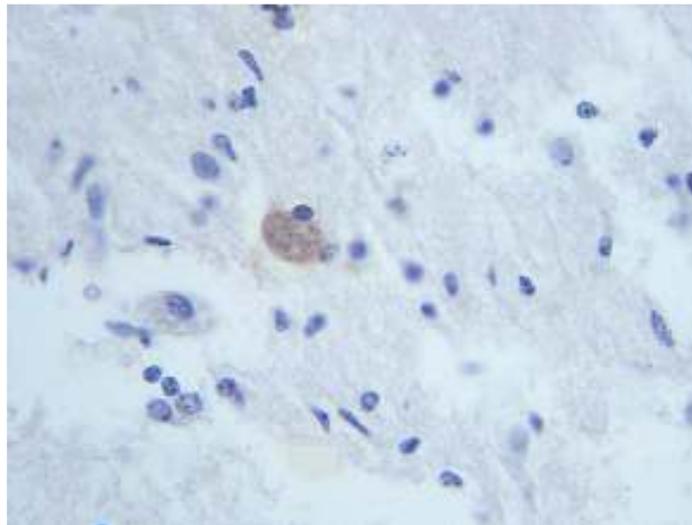


Figura 11 Infecção por *N. caninum*. Córtex cerebral de feto bovino abortado (animal A). Imunoistoquímica. Presença de cisto corado em marrom pelo anticorpo policlonal anti-*N. caninum*. Método estreptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 40

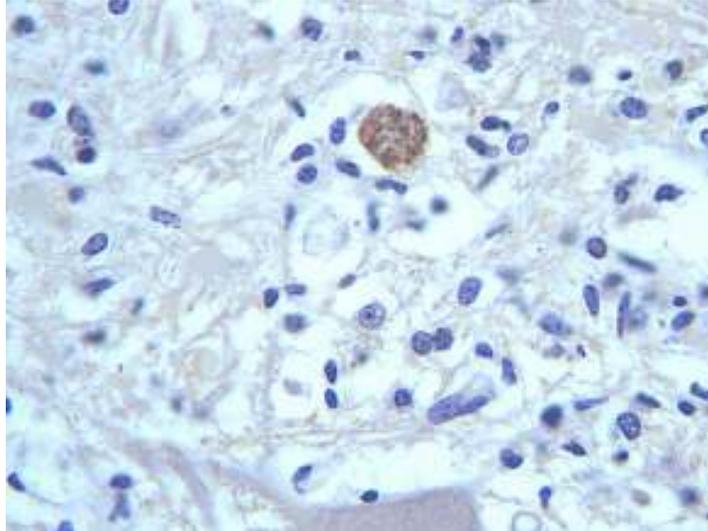


Figura 12 Infecção por *N. caninum*. Colículo rostral de feto bovino abortado (animal A). Imunoistoquímica. Presença de grupo de taquizoítos corados em marrom pelo anticorpo policlonal anti-*N. caninum*. Método estreptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 40

No músculo esquelético de um animal (animal T) ocorreu marcação positiva de grupos de taquizoítos, um deles associados ao infiltrado mononuclear e outro entre os feixes musculares, distante da inflamação (Figura 13).

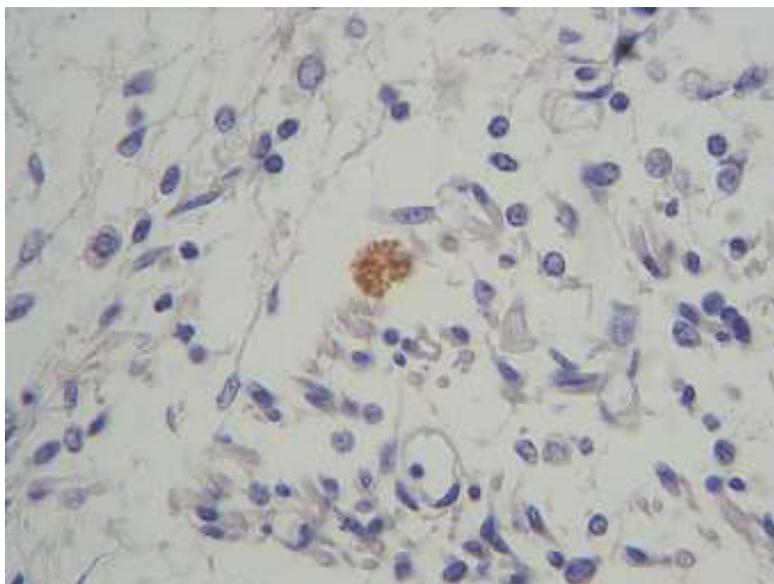


Figura 13 Infecção por *N. caninum*. Músculo esquelético de feto bovino abortado (animal T). Imunoistoquímica. Presença de grupos de taquizoítos entre as fibras musculares. Método estreptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 40

Todos os animais positivos na imunoistoquímica (IHQ) para *N. caninum* foram negativos na marcação IHQ para *T. gondii*.

Quadro 4 Resultado dos testes de Histopatologia, PCR e IHQ em amostras clínicas

Animal	Amostra	Órgão	Lesão	IHQ	PCR- β actina	PCR-RR-NC
A	01	Coração	Compatível	Não	Não	Não
	02	Encéfalo	Compatível	Sim	Sim	Sim
B	03	Coração	Compatível	Não	Não	Não
	04	Encéfalo	Compatível	Não	Sim	Não
C	05	Coração	-	Não	Sim	Não
	06	Encéfalo	Compatível	Não	Sim	Sim
D	07	Coração	-	Não	Não	Não
	08	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
E	09	Coração	-	Não	Não	Não
	10	Encéfalo	-	Não	Não	Não
F	11	Coração	-	Não	Sim	Não
	12	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
G	13	Coração	-	Não	Sim	Não
	14	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
H	15	Coração	-	Não	Não	Não
	16	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
I	17	Coração	Compatível	Não	Sim	Não
	18	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
J	19	Coração	-	Não	Não	Não
	20	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
K	21	Coração	-	Não	Sim	Não
	22	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
L	23	Coração	-	Não	Sim	Não
	24	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
M	25	Coração	-	Não	Sim	Não
	26	Encéfalo	Compatível	Não	Sim	Sim
N	27	Coração	-	Não	Sim	Não
	28	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
O	29	Coração	-	Não	Sim	Não
	30	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
P	31	Coração	-	Não	Sim	Não
	32	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
Q	33	Coração	-	Não	Sim	Não
	34	Encéfalo	Compatível	Sim	Sim	Não
R	35	Coração	-	Não	Sim	Não
	36	Encéfalo	Compatível	Não	Sim	Sim
S	37	Coração	-	Não	Sim	Não
	38	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
T	39	Coração	-	Não	Sim	Não
	40	Encéfalo	Compatível	Sim	Sim	Sim
U	41	Coração	-	Não	---	---
	42	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
V	43	Coração	-	Não	Sim	Não
	44	Encéfalo	-	Não	Sim	Não
W	45	Coração	-	Não	Sim	Não
	46	Encéfalo	-	Não	Sim	Não

X	47	Coração	-	Não	Sim	Não
	48	Encéfalo	-	Não	Sim	Não

6.4 Extração de DNA

Conforme o Quadro 4, 47 amostras de tecidos foram extraídas o DNA e submetidas a PCR para o gene de β -actina bovina. Ambos de coração e cérebro. Esses dados são descritos de forma mais detalhada no Quadro 5.

6.4.1 PCR β -actina bovina

Os resultados da PCR de β -actina bovina apontaram a disponibilidade de amostras de DNA de cérebro e amostras de DNA de coração como aptas a serem submetidas à PCR. Parte dos resultados estão representados na Figura 14, a título de ilustração do processo de verificação da qualidade do DNA extraído.

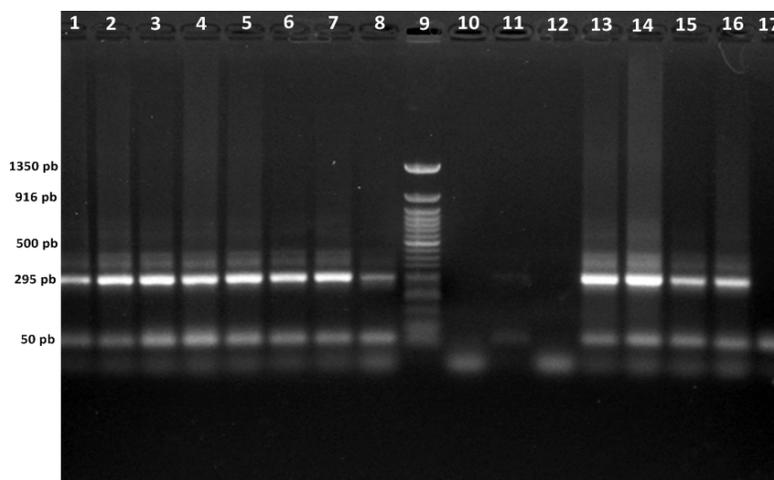


Figura 14 Imagem da eletroforese aplicada nos produtos da PCR para o gene de β -actina bovina. Canaletas: 1 a 7 – amostras clínicas, 8 – controle positivo, 9 – padrão de tamanho de DNA, 10 – controle negativo; e 11 a 17 outras amostras clínicas

6.4.2 PCR-RR-NC

Obeve-se a padronização da PCR-RR-NC, com sucesso, um fragmento esperado de 588pb representado pela Figura 15. Este fragmento de DNA formado corresponde a região de ITS-1 completo mais uma parte das regiões de subunidades ribossomais.

O fragmento de 588pb, após amplificado e submetido a eletroforese, foi visualizado em forma de banda e está representado na Figura 16. A aplicação do programa BlastN, com vistas a determinar o grau de similaridade entre as sequências obtidas nesta PCR e aquelas depositadas no GenBank demonstrou resultados acima de 90% com dezenas de sequências de *N. caninum*, o que confirmou a especificidade analítica da PCR-RR-NC.

A posição do fragmento de 588pb desta PCR está ilustrado na Figura 15. Este situa-se entre as posições 4 – 592 dentro da região do DNA ribossomal de *N. caninum*, ao se utilizar como referência a sequência L49389.

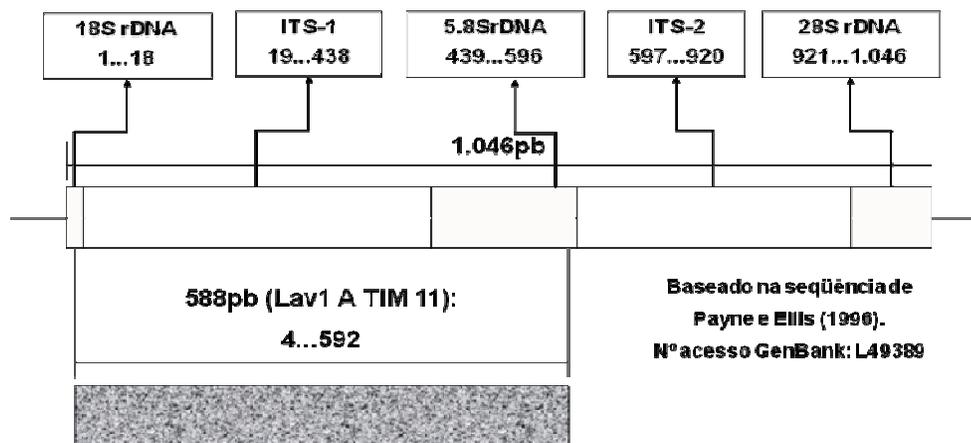


Figura 15 Esquema que ilustra a posição do fragmento de DNA com 588pb, obtido na PCR-RR-NC, situado na posição 4 a 592 dentro da sequência de 1046 nucleotídeos descrita por Payne e Ellis (1996)

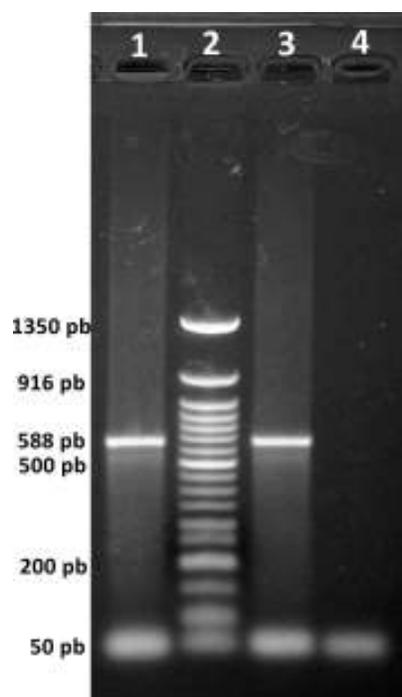


Figura 16 Imagem que ilustra a posição das bandas de DNA geradas após eletroforese dos produtos da PCR-RR-NC. Canaletas: 1 – Controle Positivo; 2 – Controle Tamanho; 3 – Amostra clínica; 4 – Controle Negativo. Imagem em gel de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídeo

6.4.3 PCR das amostras clínicas

As amostras clínicas foram testadas para a PCR de *N. caninum* e dos 24 bovinos, cinco mostraram-se positivos (três fetos e duas bezerras). A Figura 17 apresenta bandas de 588 pb e arraste no gel de agarose após a PCR-RR-NC de amostras clínicas.

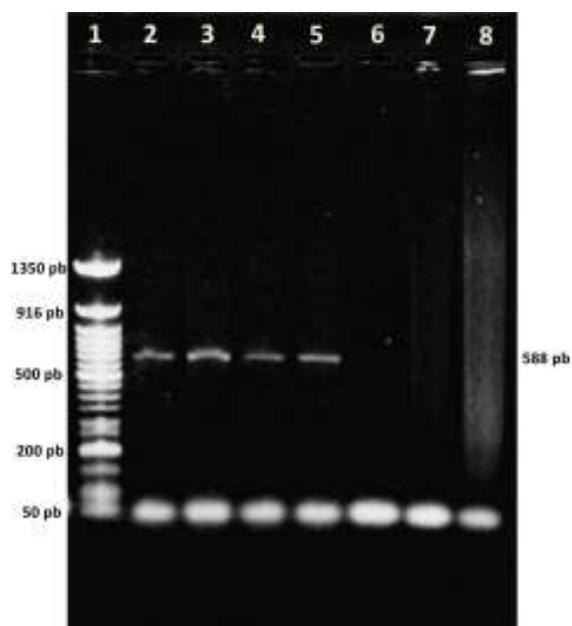


Figura 17 Imagem dos produtos de PCR-RR-NC em amostras clínicas. Canaletas: 1 – Controle Tamanho; 2 – Controle Positivo; 3 – Amostra clínica; 4 – Amostra clínica; 5 – Amostra clínica; 6 – Controle Negativo; 7 – Amostra clínica; 8 – Amostra clínica. Imagem de gel de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídeo

As amostras clínicas foram submetidas aos exames histopatológicos e imunoistoquímico. O Quadro 5 demonstra as relações entre as cinco amostras positivas para a PCR de *N. caninum*. Todas as amostras apresentaram lesões compatíveis para neosporose bovina.

Quadro 5 Relação de amostras de tecidos bovinos com resultados da PCR de β -actina bovina e PCR de *N. caninum*

Nº animais	Amostras	Nº amostras com DNA extraído	Controle de qualidade do DNA para PCR de B-actina	Amostras Positivas para PCR-RR-NC
24	Coração	23	17	---
	Encéfalo	24	23	05

6.5 Sequenciamento

Após a realização da PCR para parte da região codificadora de rRNA de *N. caninum*, procedeu-se o sequenciamento. As sequências gênicas foram convertidas em formato FASTA, editadas e o programa BlastN confirmou especificidade acima de 90% para *N. caninum*.

O Quadro 6 relaciona as amostras clínicas obtidas no presente trabalho, que foram sequenciadas, editadas e submetidas ao GenBank.

Quadro 6 Relação de seqüências submetidas ao Genbank, os respectivos nomes e o número de acesso gerado. Também é apresentada a identificação do animal e sua origem geográfica

Amostra clínica	Nome	Nº de acesso no Genbank	Animal	Local
06	BR/MG-1	HM229410	C	Ijaci - MG
26	BR/MG-2	HM229411	M	Conc. da Barra de Minas - MG
40	BR/MG-3	HM229412	T	Ijaci - MG

A Figura 18 apresenta as três seqüências consenso em formato FASTA que foram submetidas ao GenBank.

```

>BR/MG-1 539 bases
ctttattcttttcaaccctcaacgtttgcaatccggaattcaaaacatga
gcttgtatctctctccttcggagaggggtacattcaagaagcgtgatata
ctactccctgtgagttgtatcgccttcttcatgtggatattttgcactac
tttttcaagcgttctattgaacgcctgataatgaaagtgtgtgatata
tccgggagtgtagggcgaagggactcggtcactggaaattaatgtctcta
tgggactttaacttcaggagttcttcaatgtgcattctttttccca
caccgttattttaacaacaaatctggatagcgtttgaggggaagagaaag
atggctctcttctgtatttctctctattcgccttcagattacttactaaa
aactataatgtgtttctaaattttcagcaatggatgtcttggctcgcgca
acgatgaaggacgcagcgaactgcgaaacgcaactgtgaattgcagaatt
cagtgaaatcatcagatttctgaacgcaaatggggccttg

>BR/MG-2 491 bases
aacatgagcttgtatctctctccttcggagaggggtacattcaagaagc
gtgatatactactccctgtgagttgtatcgccttcttcatgtggatattt
tgcactacttttttcaagcgttctattgaacgcctgataatgaaagtgtg
tgcataatccgggagtgtagggcgaagggactcggtcactggaaatta
tgtctctatttgggactttaacttcaggagttcttcaatgtgcattctt
ttttccacaccgttattttaacaacaaatctggatagcgtttgagggga
agagaaagatggctctcttctgtatttctctctattcgccttcagattac
ttactaaaaactataatgtgtttctaaattttcagcaatggatgtcttgg
ctcgcgcaacgatgaaggacggcagcgaactgcgaaacgcaacatgtgaa
ttgcggaattcagtgaaatcctcagatttctgaacgcaaat

> BR/MG-3 392 bases
aaaacatgagcttgtatctctctccttcggagaggggtacattcaagaag
cgtgatatactactccctgtgagttgtatcgccttcttcatgtggataat
ttgcactacttttttcaagcgttctattgaacgcctgataatgaaagtgt
gtgcataatccgggagtgtagggcgaagggactcggtcactggaaatta
atgtctctatttgggactttaacttcaggagttcttcaatgtgcattctt
ttttccacaccgttattttaacaacaaatctggatagcgtttgagggg
aagagaaagatggctctcttctgtatttctctctattcgccttcagatca
cttactaaaaactataatgtgtttctacaatttttcagcgcg

```

Figura 18 Representação das seqüências de nucleotídeos das amostras 06, 26 e 40, editadas no padrão FASTA. A primeira linha de cada seqüência contém o nome da seqüência e o número total de nucleotídeos

6.6 Filogenia

Para que a árvore filogenética possa ser gerada é necessário que se alimente o programa com sequências de mesmo tamanho (número de posições de nucleotídeos). Desta forma, foi efetuado um cuidadoso processo de editoração das sequências obtidas no presente trabalho, de forma a se caracterizar as eventuais deleções que ocorreram em cada sequência utilizada e, na posição equivalente, se inserir um símbolo de traço (-), que é interpretado pelo programa como deleção. Como ponto de partida desta edição se empregou o programa de acesso livre MultAlin (2010). Neste processo também se definiu o exato ponto de início e término das sequências. A Figura 19 apresenta o alinhamento das três sequências obtidas neste estudo, alinhadas com a sequência de referência produzida por Payne e Ellis (1996), por meio do programa MultAlign. A Figura 20 representa a esquematização do tamanho e da posição do alinhamento dentro da região codificadora de rRNA de *N. caninum*, segundo a sequência de referência L49389.

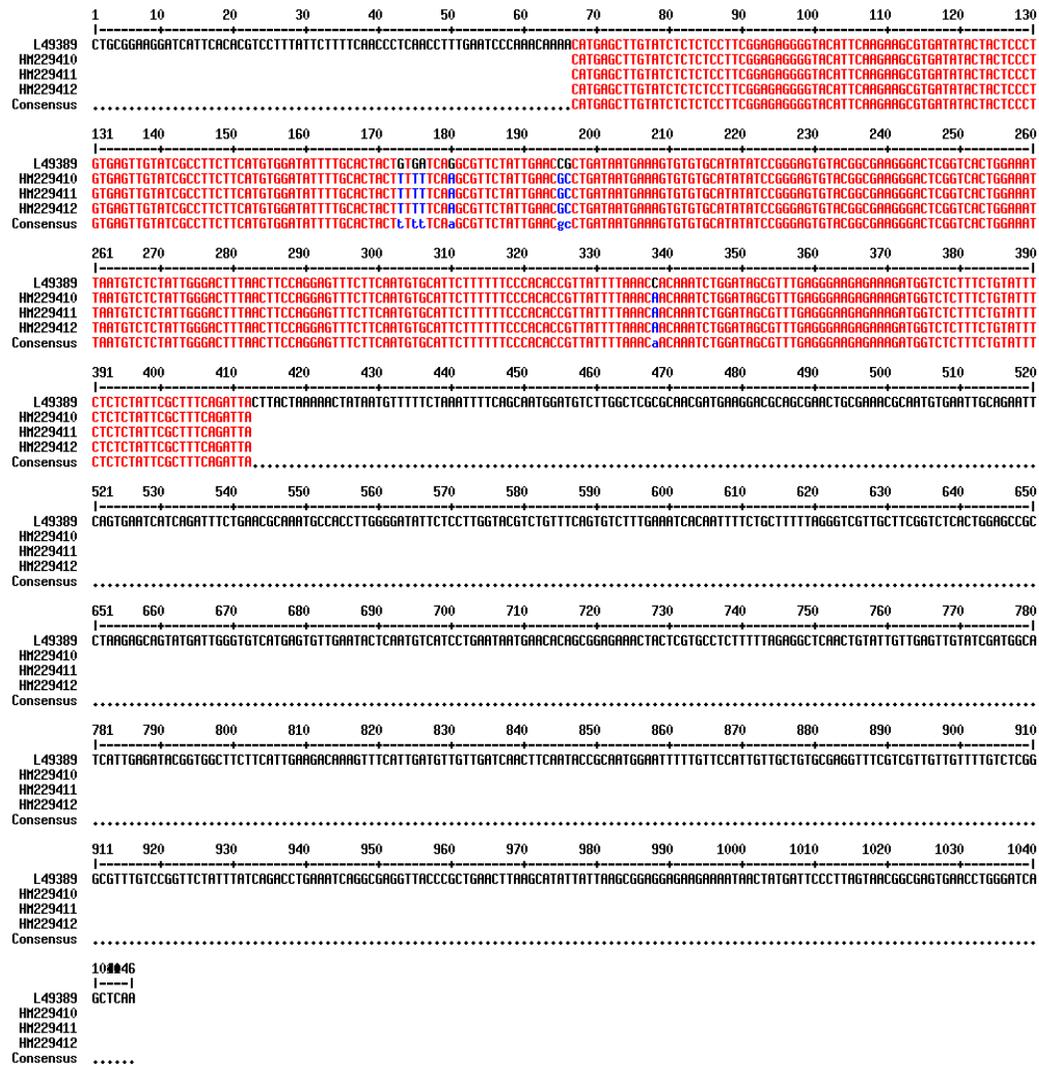


Figura 19 Resultado do alinhamento das sequências obtidas neste estudo com a sequência de Payne e Ellis (1996), obtido no programa MultAlin. Observa-se o consenso entre 346 bases, destacado em cor vermelha. As bases marcadas pelo programa em cor azul são diferentes da mesma base na sequência de referência e, portanto, caracterizam-se como mutações em relação a esta

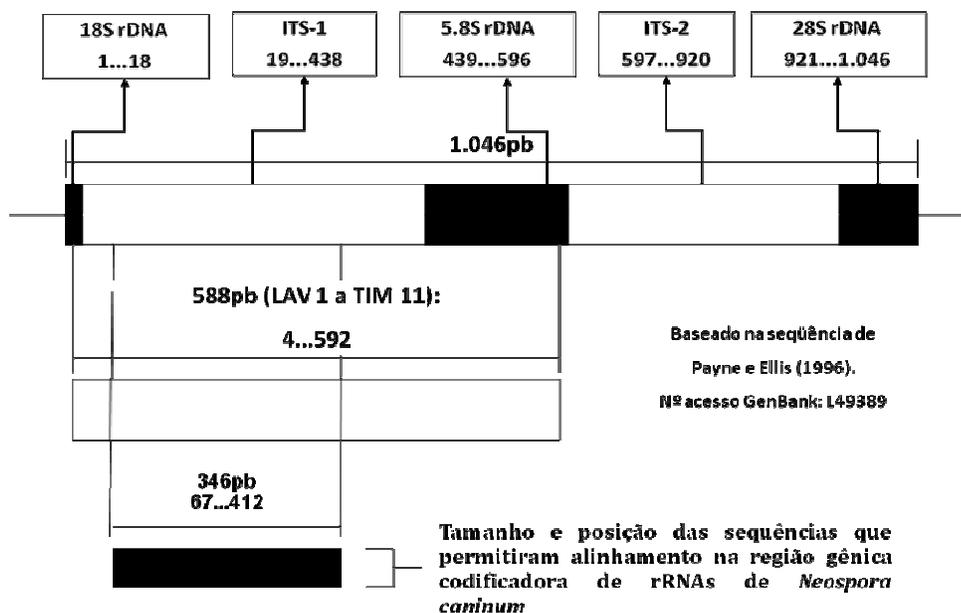


Figura 20 Esquema que ilustra a posição do fragmento de DNA com 346pb, obtido na edição para obtenção de sequências do mesmo tamanho. Inicia-se na posição 67 e se estende até a posição 412, dentro da sequência de 1046 nucleotídeos descrita por Payne e Ellis (1996). Destaca-se o detalhe de que todo o fragmento se encontra dentro de ITS-1

A Figura 21 apresenta a árvore filogenética gerada pelo programa MEGA4, utilizando o método Neighbor-Joining. Foram utilizadas as sequências obtidas neste trabalho mais aquelas relacionadas no Anexo C, todas editadas conforme descrito no parágrafo anterior. Também se inseriu nas análises sequências de outros parasitos da sub-família Toxoplasmatinae, para permitir a análise inter-espécies.

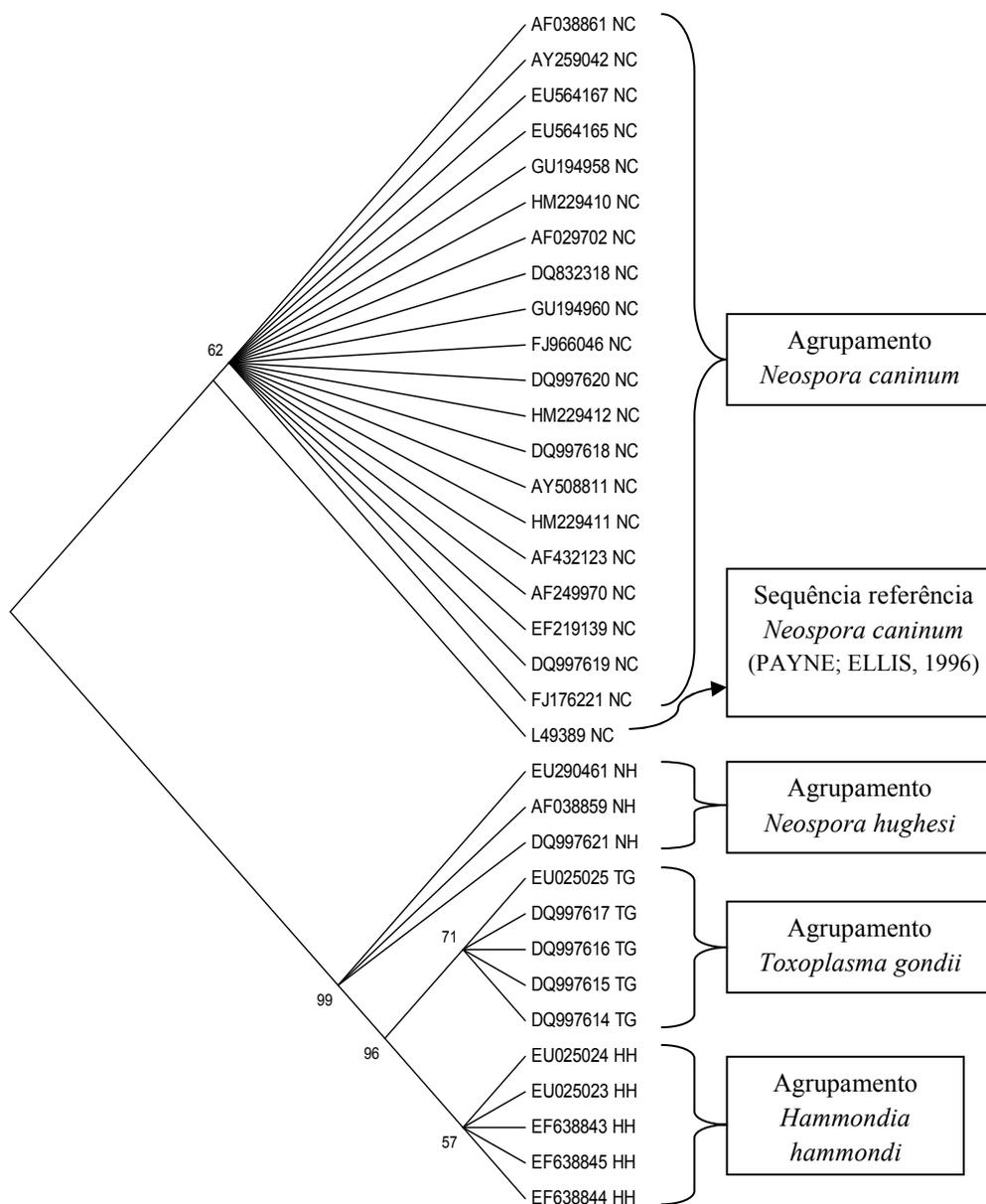


Figura 21 Relações filogenéticas de 34 sequências de parte da região gênica ITS-1 de protozoários da sub-família Toxoplasmatinae representados pelos parasitos: *N. caninum* (NC), *N. hughesi* (NH), *T. gondii* (TG) e *H. hammondi* (HH). Os nós terminais estão representados pelo nº de

acesso ao GenBank e por letras sugestivas de iniciais dos parasitos. A árvore filogenética aqui demonstrada foi construída por meio do método Neighbor-Joining, no programa MEGA4, com *cut-off* de 50%. As sequências identificadas com HM229410, HM229411 e HM229412 foram obtidas neste estudo, especificamente na região próxima a Lavras-MG, Brasil. As demais foram publicadas por outros autores e estão disponíveis no Banco Mundial de genomas

O Quadro 7 apresenta as mutações presentes nas sequências de parte da região codificadora de rRNA obtidas neste trabalho, em relação as outras sequências de *N. caninum* depositadas no GenBank. Deve ser destacado que as três sequências apresentaram as mesmas mutações e não diferiram entre si. Para caracterização destas mutações empregou-se o alinhamento por meio do programa *ClustalW*. O resultado deste alinhamento, bem como de outros protozoários da sub-família Toxoplasmatinae, encontra-se anexo a este trabalho, na forma de figura.

Quadro 7 Relação das mutações observadas nas sequências obtidas neste estudo, em comparação com as demais sequências gênicas depositadas no GenBank referentes a parte da região codificadora de rRNA de *Neospora caninum*. Cada posição de mutação foi baseada na sequência descrita por Payne e Ellis (1996) e gerada pelo alinhamento no programa *ClustalW*. O número da sequência gênica depositada no GenBank referente a mutação

Nº de acesso	Tipo de mutação	Posição gênica baseada em L49389 (1–1046)	Sequência referência
HM229410 HM229411 HM229412	Transversão (G→T)	173	L49389
	Transversão (G→T)	175	
	Transversão (A→T)	176	
	Transição (G→A)	180	
	Transversão (C→G)	195	
	Transversão (G→C)	196	
	Transversão (C→A)	338	
	Deleção (A)	75	FJ176221
	Deleção (T)	384	FJ966046
Deleção (T)	385	AY259042	

7 DISCUSSÃO

7.1 Achados histopatológicos e imunoistoquímicos

Os achados histopatológicos de encefalite não supurativa associado a necrose tecidual e gliose observados nos fetos e em duas bezerras deste estudo estão de acordo as lesões descritas para a neosporose (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996; HELMAN et al., 1998; ORTEGA-MORA; FERNANDEZ-GARCIA; GOMEZ-BAUTISTA, 2006).

Porém, no presente estudo, as lesões foram encontradas tanto no córtex cerebral como no tronco encefálico, sendo muitas vezes mais acentuada e frequente neste último. Entretanto, estes achados diferem dos relatados por alguns autores que observaram uma tendência do córtex ter mais lesões se comparado com a porção média e superior do tronco cerebral (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; HELMAN et al., 1998).

As lesões encontradas no coração e fígado também estão de acordo com as descritas para neosporose, como a miocardite não supurativa moderada a acentuada (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998), e as lesões hepáticas de infiltrado mononuclear periportal e focos de necrose hepatocelular (BARR et al., 1990).

Nesse estudo, cistos de *N. caninum* foram visualizados no H.E. em um único feto, no músculo esquelético, e na imunoistoquímica no cérebro de dois fetos. Já taquizoítos foram observados mais frequentemente no encéfalo e músculo esquelético. Estes achados também estão de acordo aos descritos na literatura (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; ORTEGA-MORA; FERNANDEZ-GARCIA; GOMEZ-BAUTISTA, 2006; PESCADOR et al., 2007). A ocorrência de cistos já foi descrita somente no cérebro, medula espinhal (BARR et al., 1990; DUBEY;

BUXTON; WOUUDA, 2006) e no músculo esquelético (PETERS et al., 2001). Porém taquizoítos já foram observados em células de diversos órgãos de animais infectados (DUBEY; LINDSAY, 1996).

O percentual de positividade na IHQ neste estudo foi de 37,5% quando comparado ao número total de amostras com lesões compatíveis a neosporose bovina (n= 08).

Pescador et al. (2007) e More et al. (2008) apresentaram porcentagens mais altas do que a deste estudo; porém, no trabalho de Cabral et al. (2009), a porcentagem de positivos na IHQ foi de 8, 57%.

No estudo de Coberllini et al. (2000), de oito amostras bovinas com lesões compatíveis para *N. caninum*, 50% foram positivas na IHQ, sendo um e três casos, respectivamente, para coração e cérebro. Estes resultados, comparados com os obtidos no presente estudo, reforçam a idéia de que *N. caninum* esta presente em maior quantidade no cérebro (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; HELMAN et al., 1998; PATRÍCIO, 2008).

No presente estudo, os achados histopatológicos e imunoistoquímicos de *N. caninum* em conceptos bovinos, demonstram que o parasito circula em rebanhos do estado de Minas Gerais, sendo que a maioria dos animais é proveniente de propriedades localizadas no sul do Estado.

7.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

A extração e a purificação de DNA a partir de amostras experimentais como tecidos é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a PCR.

Segundo Oliveira et al. (2007), a molécula de DNA apresenta resistência e estabilidade a fatores externos e se mantém inalterada à variações do meio.

Para obtenção de DNA de boa qualidade foram adotados alguns cuidados, tais como conservação adequada dos tecidos obtidos, uso de reagentes e insumos de padrão apropriados para biologia molecular, extração paralela de controle negativo (água), boas práticas de laboratório para evitar contaminações cruzadas e extração em duplicata.

Antes de proceder aos ensaios de PCR de parte da região codificadora de rRNA para *N. caninum*, a acessibilidade ao processo de PCR do DNA extraído das amostras clínicas foi verificada. Foi aplicada uma PCR padronizada para amplificar parte do gene codificador da proteína β -actina bovina, gene constitutivo do genoma bovino. Desta forma, esta PCR foi empregada como controle de qualidade do processo de extração e purificação do DNA de origem cerebral e cardíaco. Este experimento teve por objetivo descartar fatores intrínsecos da reação de PCR como causa de eventuais resultados negativos nos experimentos de amplificação do DNA do parasito nas amostras. Ao se constatar a amplificação do fragmento compatível com o esperado para o gene β -actina, é possível ter certeza de que o DNA obtido encontrava-se adequado para PCR, ou seja, foi extraído e purificado com sucesso. Por conseguinte, o eventual DNA de *N. caninum* presente na amostra também estaria.

As amostras que apresentaram resultado negativo na PCR do gene β -actina foram consideradas inaptas para a PCR-RR-NC e foram submetidas novamente aos processo de extração e purificação. Entre as possíveis causas da não amplificação estão a presença de fatores de inibição de PCR, tais como resíduos de proteína tecidual, sais dos tampões de extração, fenol ou álcool. A integridade do DNA genômico também interfere diretamente no sucesso da PCR, onde condições inadequadas de conservação e manipulação das amostras clínicas pode acarretar em autólise dos tecidos ou degradação do DNA por enzimas DNAases.

Este fenômeno nem sempre ocorre, haja vista Paula et al. (2004) constatarem que a PCR pode apresentar resultados positivos mesmo em amostras autolisadas fetais, fato também observado nos experimentos deste trabalho. Infelizmente, as condições em que os fetos chegavam para necropsia nem sempre eram ótimas, em função do tempo entre a morte fetal e a expulsão do útero materno, ou ainda em função de falhas na rapidez da coleta do feto no pasto, temperatura ambiente durante a permanência do feto no pasto, ação de animais carniceiros e transporte inadequado. Mas, apesar disto, os tecidos encontrados nestas condições foram coletados e o processo de extração e purificação de DNA foi executado.

Conclui-se, portanto, que o sistema de PCR direcionado para o gene constitutivo β -actina foi uma ferramenta prática e de valor dado seu realismo, evitando-se desperdícios em tentativas de amplificação onde o DNA não estava apropriado. Como desvantagem do uso deste processo está a elevação do consumo de materiais, reagentes e kits de PCR.

Após se constatar que o DNA estava adequado para as PCRs, a próxima etapa foi à padronização de uma PCR de parte da região codificadora de rRNA de *N. caninum*. Para isso, foi empregado iniciador anti-senso descrito em literatura (PAYNE; ELLIS, 1996), denominado TIM 11. Como iniciador senso foi selecionado um a partir da sequência de referência L49389, que foi denominado Lav1, especificamente desenhado para este estudo. Após a padronização desta PCR, com as condições de temperatura e concentração específicas de amplificação, foram obtidas cinco amostras positivas para *N. caninum*.

Após os resultados da PCR-RR-NC, foi feita uma análise de correlação de resultados entre a PCR, a histopatologia e a imunoistoquímica. O objetivo desta análise foi verificar o grau de concordância das técnicas. Grande parte dos tecidos que apresentaram lesões sugestivas de *N. caninum* foram positivas para

PCR-RR-NC e das três amostras positivas para IHQ duas foram concomitantes para os resultados da PCR-RR-NC. Este dado corrobora com as idéias de Baszler et al. (1999) ao apontar a PCR como um meio mais sensível do que IHQ.

Observa-se neste trabalho, que a sequência alvo selecionada foi região ITS-1, cuja região encontra-se inserida entres as regiões codificadoras de rRNAs de *N. caninum* e cuja PCR baseada no protocolo proposto por Payne e Ellis (1996) também apresenta um padrão consistente de sensibilidade analítica e elevada especificidade diagnóstica (OKEOMA et al., 2004). Segundo ainda Payne e Ellis (1996), a região ITS é alvo de maior pressão mutagênica evolucionária, apresenta polimorfismo e, por isso, se tornou uma sequência eletiva para análises filogenéticas populacionais e inter-espécies.

As mutações observadas neste estudo foram substituições e deleções. Entre as mutações por substituição, a transversão foi a mais ocorrida. Uma mutação onde há troca de uma base purina por uma pirimidina, ou vice-versa. É um tipo de mutação que pode complicar mais regiões codificadoras de proteína, o que não foi o caso das regiões ITS, porém as deleções podem comprometer a matriz de leitura (PIERCE, 2004).

O percentual de mutações intra-específicas foi relativamente baixo (4%) neste estudo, e este resultado confronta com os dados de Payne e Ellis (1996) ao afirmar que a região ITS-1 de *N. caninum* é tolerante as mutações gênicas e que é uma região de polimorfismo. Porém, ao comparar com as mutações inter-específicas referentes a sub-família Toxoplasmatinae, pode-se observar que a PCR-RR-NC deste trabalho representa uma ferramenta diagnóstica altamente específica.

Conforme observado, o sequenciamento da região de ITS-1 do rDNA é uma caracterização molecular muito importante para discriminar a variabilidade inter e intra-espécies, como os membros da sub-família Toxoplasmatinae.

Gondim et al. (2004b) sugerem que o sequenciamento dos ITSs pode ser aplicado como instrumento de identificação de *N. caninum*.

Das cinco amostras de DNA em duplicata que passaram pela PCR e que deram positivas para *N. caninum*, três foram sequenciadas com sucesso. Os iniciadores TIM 11 criados por Payne e Ellis (1996) formaram um produto de sequenciamento irregular e arquivos em cromatograma indistintos. Porém, os iniciadores LAV1 criados neste estudo contribuíram de forma precisa para um sequenciamento adequado. Estes dados foram confirmados quando se alinharam as sequências, obtidas no sequenciamento, com a sequência de referência de Payne e Ellis (1996) no programa Mult Alin.

Após editadas e confirmadas sua especificidade no BlastN, as sequências gênicas deste estudo puderam alimentar outros programas de bioinformática.

7.3 Dados filogenéticos

As análises filogenéticas foram realizadas com o auxílio do programa MEGA4 e a árvore filogenética foi criada pelo método Neighbor-Joining.

A partir de dados descritos por Payne e Ellis (1996) em relação a região do DNA codificadora de rRNA de *N. caninum*, muitos autores publicaram diversos trabalhos. Entretanto, ao analisar parte desta região correspondente a região ITS-1 e a subunidade 5,8S, poucos estudos mostraram variações nucleotídicas.

Ao analisar as sequências gênicas de parte da região codificadora de rRNA de *N. caninum* obtidas neste estudo e a maioria das obtidas no Genbank, não se observou alterações gênicas entre si, porém ao se alinhar a sequência de referência de Payne e Ellis (1996) mostrou-se alterações em algumas posições no gene e que foram descritas no Quadro 7.

O resultado deste alinhamento apresentou alta conservação entre as sequências gênicas de *N. caninum*. Esta homologia entre espécies *N. caninum* de diferentes posições geográficas pode ser indício de uma maior comercialização de animais hospedeiros deste parasita, devido à facilidade de transporte, tornou-se muito intensa a movimentação de animais de uma região para outra e a consequente distribuição de uma cepa geneticamente dominante e homogênea.

Segundo Payne e Ellis (1996), a região ITS-1 é uma região tolerante as mutações. Entretanto, as sequências referentes a esta região, obtidas neste estudo, mantiveram-se inalteradas. Sugere-se que esta conservação de sequências é devido a um controle sobre a pressão mutagênica, influenciada pela eficiente imunidade do hospedeiro e pela cronicidade da doença.

Esta conservação refletiu-se na árvore filogenética, que se caracterizou por apresentar um único agrupamento de *N. caninum*, sem distinção de origem geográfica ou tipo de hospedeiro, que foram as variáveis obtidas na literatura e, portanto, passíveis de comparação. Devido a essa conservação, sugere-se que outras regiões gênicas de *N. caninum* sejam investigadas como tentativa de obter alterações gênicas.

Graficamente, esta conservação das sequências foi demonstrada na formação da árvore filogenética representada na Figura 21, onde ramos com nós terminais para *N. caninum* formaram-se um nó interno. Porém, um único ramo com nó terminal, representado pela sequência de Payne e Ellis (1996), se separou das demais sequências, devido algumas alterações gênicas.

Esta árvore filogenética também promoveu a formação de ramos para espécies de parasitos da sub-família Toxoplasmatinae composto pelas espécies: *N. caninum*, *N. hughesi*, *T. gondii* e *H. hammondi* confirmadas por porcentagens altas e pelas separações de ramos bem definidos.

A especificidade formada pela árvore demonstra que esta região do rDNA é importante para separar espécies de protozoários parasitos muito

semelhantes pertencentes a sub-família Toxoplasmatinae, o que confirma que a PCR-RR-NC é uma eficiente ferramenta de diagnóstico, no quesito de especificidade analítica. Monteiro (2006) menciona a importância de investigações e esclarecimentos genéticos e taxonômicos dos parasitas pertencentes a esta sub-família, principalmente *N. caninum* e *T. gondii* que são agentes promotores de perdas econômicas. A autora, na verdade, aponta a importância da filogenia como meio de classificação destas espécies e como auxiliar no diagnóstico. Alvarez-Garcia (2003) e Monteiro (2006) também ressaltam que as ferramentas moleculares estão cada vez mais modernas e cabe a importância de explorá-las.

Em busca de uma variabilidade gênica, observou-se uma elevada conservação nas sequências obtidas neste trabalho. A não formação de agrupamentos sugere que as amostras de *N. caninum* existentes na região de Lavras-MG são estritamente iguais as demais que ocorrem no restante do mundo e que foram empregadas na construção desta árvore, no que tange a região gênica ITS-1. Desta forma, são necessários novos estudos em outras regiões gênicas do parasito a fim de se verificar se esta conservação é comum no genoma do parasito ou se existem regiões gênicas que seriam mais apropriadas aos estudos filogenéticos. Como os aspectos genéticos relativos a este protozoário são ainda bastante obscuros, dada a relativa recente descoberta do mesmo (DUBEY, 1988) e ao reduzido número de sequências depositadas no Genbank, este campo científico ainda encontra-se plenamente aberto à investigação.

O gênero *Neospora* é compartilhado por *N. caninum* e *N. hughesi*. Ao analisar a árvore filogenética, observa-se que os dois parasitos deste gênero se afastaram evolutivamente em relação a esta região codificadora de rRNA. Poucos estudos são conhecidos sobre *N. hughesi*, mas atualmente este parasito de equinos é enquadrado neste gênero (ALVAREZ-GARCIA, 2003). Ao se

observar a árvore filogenética obtida no presente estudo é possível se observar a formação de ramos separados para o gênero *Neospora*. De fato, *N. hughesi* se aproximou muito mais do gênero *Toxoplasma* e de *Hammondia* no presente trabalho, dado que deverá ser analisado com mais cuidado à medida que novas sequências gênicas deste parasito estiverem disponíveis no banco mundial de genomas. Estes estudos mais aprofundados poderão elucidar melhor a classificação taxonômica na sub-família Toxoplasmatinae.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A região do rDNA de *N. caninum*, proposta por Payne e Ellis (1996), abrange um tamanho de 1.024 pb e este estudo tinha como meta obter parte desta região. Apesar de não descobrirmos alterações gênicas em nossas sequências, obtivemos dados importantes como a conservação desta região, além do mais, a árvore filogenética ficou bem elucidada pelo método Neighbor-Joining e os arquivos foram alimentados pelo programa MEGA4 com dados consistentes e precisos.

A região ITS-1 foi classificada por Payne e Ellis (1996) como a região eleita para análises filogenéticas devido ao polimorfismo apresentado entre as espécies *N. caninum*. No entanto, parte desta região estudada neste trabalho mostrou alta conservação com a grande maioria das sequências deste parasita depositadas no GenBank.

Fica como sugestão, a busca de novas regiões gênicas que apresentem mutações significantes e que possam elucidar melhor a evolução de *N. caninum*.

9 CONCLUSÃO

Foi constatada uma elevada especificidade analítica para a PCR-RR-NC.

Foi constatado um elevado grau de conservação na região gênica de ITS-1 de *N. caninum*.

Não foi possível se diferenciar uma cepa de *N. caninum* específica do sul de Minas Gerais, por meio da análise genética de ITS-1.

O parasita *N. hughesi* se mostrou mais próximo, filogeneticamente, dos gêneros *Toxoplasma* e *Hammondia*, do que do gênero *Neospora*, em relação a região gênica estudada.

Os resultados da histopatologia, imunoistoquímica e PCR serviram de diagnóstico da neosporose em conceptos bovinos e pode-se confirmar a presença de *N. caninum* infectando animais provenientes das regiões Sul, Centro-oeste e Zona da Mata do estado de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- ÁLVAREZ-GARCÍA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de “*Neospora caninum*” con interés inmunodiagnóstico en bovinos.** 2003. 302f. Tese (Doutorado em Veterinária) - Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.
- ANDERSON, M. L. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 198, n. 2. p. 241-244, Jan. 1991.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, n. 1, p. 417-431, July 2000.
- ANDREOTTI, R. et al. **Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003. 51p.
- BARR, B. C. et al. *Neospora* like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 3, n. 1, p. 39-46, Jan. 1991.
- BARR, C. B. et al. Bovine fetal encephalitis and muocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 27, n. 5, p. 354-361, Sept. 1990.
- BASZLER, T. V. et al. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1635-1646, Oct. 1999.
- BENSON, D. A. et al. GENBANK: The Nucleotide Sequence Database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, D25-30, Dec. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073190?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum>. Acesso em: 26 maio 2010.

BJERKAS, I.; MOHN S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cystforming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v. 70, n. 2, p. 271-274, Mar. 1984.

BJORKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, Oct. 1999.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 546-552, Dec. 2002.

CABRAL, A. D. et al. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 14-19, out./dez. 2009.

COLLANTES-FERNANDES, E. et al. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 187-191, Nov. 2006a.

COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. **Theriogenology: an international journal of animal reproduction**, Stoneham v. 65, n. 3, p. 629-641, Feb. 2006b.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. et al. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, Apr. 2002.

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**, Columbia, v. 13, n. 5, p. 416-419, Sept. 2001.

CORBELLINI, L. G. et al. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 863-868, set./out. 2000.

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

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

DUBEY, J. P. et al. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 2, p. 345-353, Apr. 2001.

DUBEY, J. P. et al. Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3/4, p. 158-166, Nov. 2007.

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

DUBEY, J. P. Neosporosis in Cattle. **The Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 473-483, July 2005.

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

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

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1/2, p. 1-34, Aug. 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, Apr. 2007.

GARCIA-MELO, D. P. et al. Isolation and biological characterisation of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. **Acta Parasitologica**, Warsaw, v. 54, n. 2, p. 180-185, June 2009.

GONDIM, L. F. et al. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 6, p. 1361-1365, Dec. 2004a.

GONDIM, L. F. et al. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 1, p. 119-122, Feb. 2004b.

GONDIM, L. Q. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1/2, p. 121-124, Feb. 2010a.

GONDIM, L. Q. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1/2, p. 121-124, Feb. 2010a.

GORAB, E. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. In: MATTIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 6, p. 64-69.

GUEDES, M. H. P. **Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do Sul de Minas Gerais**. 2006. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; ROMANELLI, P. R. Neosporose em animais domésticos. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 665-678, out./dez. 2006.

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

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

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

JENKINS, M. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 631-636, May 2002.

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

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 103-109, jul./set. 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **Veterinary Record**, London, v. 153, n. 12, p. 366-367, Sept. 2003.

LONG, M. T.; BASZLER, T. V. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 82, n. 4, p. 608-611, Aug. 1996.

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

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

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

MILLS, B. Immunohistochemistry. In: PROPHET, E. B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: AFIP, 1992. cap. 23, p. 247-255.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. de M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATTIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 9, p. 97-107.

MONTEIRO, R. M. **Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1)**. 2006. 150 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MONTEIRO, R. M. et al. Molecular phylogenetic analysis in hammondia-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. **Parasitology**, Cambridge, v. 134, pt. 9, p. 1195-1203, Aug. 2007.

MOORE, D. P. et al. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n. 4, p. 303-316, Aug. 2002.

MOORE, D. P. et al. The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 156, n. 3/4, p. 163-167, Oct. 2008.

MOORE, D. P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.127, n. 2, p. 87-97, Jan. 2005.

MORALES, E. et al. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 125, n. 1, p. 58-63, July 2001.

MULTALIN: Multiple sequence alignment by Florence Corpet. Disponível em: <<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>>. Acesso em: 17 jul. 2010.

NCBI. National Institute of Health. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 17 jul. 2010.

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

OLIVEIRA, M. C. de S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e deamplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Empresa Pecuária Sudeste, 2007.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribossomal RNA: a key to phylogeny. **The FASEBJ Journal**, Bethesda, v. 7, n. 1, p. 113-123, Jan. 1993.

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

PATRÍCIO, M. A. DE C. **Investigação de neosporose em encéfalos de bovinos, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr), com quadro de encefalopatia e diagnóstico negativo para raiva, no estado do Paraná, Brasil**. 2008. 105 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

PAULA, V. S. et al. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, n. 7, p. 581-585, Oct. 2004.

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

PENA, H. F. et al. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/2, p. 61-66, June 2007.

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

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

PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 758 p.

PRADO, O. G. **Computação evolutiva empregada na reconstrução de árvores filogenéticas**. 2001. 186p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

RAGOZO, A. M. A. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

ROBERTS, J. S. **Obstetricia veterinaria y patologia de la reproduccion**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1984. 1021 p.

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

RUSSO, C. A. de M.; MIYAKI, C. Y.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In: MATTIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 10, p. 108-116.

RZHETSKY, A.; NEI, M. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, n. 5, p. 945-967, Sept. 1992.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, July 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1659 p.

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

SANTOS, S. L. et al. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 457-461, Jan. 2010.

SCHARDT, E.; SINSHEIMER, J.; LANGE, K. Computational advances in maximum likelihood methods for molecular phylogeny. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 222-233, Mar. 1998.

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

SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA; SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE RICKETTISIOSES, 3., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004. p. 29-33.

SILVA, M. I. S. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 2, p. 455-461, abr./jun. 2008.

SILVA, M. S. et al. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162 n. 1/2, p. 156-159, May 2009.

SLAPETA, J. R. et al. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 109, n. 3/4, p. 157-167, Nov. 2002.

SOARES, R. M. et al. **Detection and identification of *Neospora caninum* in a buffalo fetus from Brazil**. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/70609429>>. Acesso em: 29 jan. 2010.

VARASCHIN, M. S. et al. Neosporose em caprinos no município de Lavras, Minas Gerais. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DA C. L. DAVIS FOUNDATION, 2., 2007, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: C. L. DAVIS FOUNDATION, 2007. p. 144-145 (Relato de caso de grandes animais).

WATSON, J. D. et al. **Biologia molecular do gene**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 760p.

WOUDA, W. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1677-82, Oct. 1999.

ANEXO A – Sequências gênicas

Relação de sequências gênicas referentes a região codificadora de rRNA de *N. caninum* disponíveis no GenBank, nome da sequência e local realizado (atualizado até maio de 2010). Os trabalhos podem ser conferidos no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> pelo nº de acesso

Nº acesso ao GenBank	Nome	Local
L49389.1	--	Austrália
AF432123.1	CZ-4	República Tcheca
AY463245.1	---	Nova Zelândia
AY601349.1	NcNZ 2	Nova Zelândia
AY601348.1	NcNZ 3	Nova Zelândia
AY601347.1	NcNZ 1	Nova Zelândia
AF029702.1	Swe-B1 strain	Suécia
U16159.1	N.C.-Liverpool	Suécia
U16160.1	N.C.-1	Suécia
AF038861.1	CN1	EUA
AF038860.1	BPA1	EUA
DQ832318.1	Brazil	Brasil
DQ997619.1	10_06	Brasil
DQ997618.1	PR	Brasil
AY508811.1	NC-deer1	EUA
AY259041.1	NC-Illinois	EUA
AY259040.1	NC-beef	EUA
AY259039.1	Nc-SweB1	Suécia
AY259038.1	NC-Liverpool	Suécia
AY259037.1	NC-2	EUA
AF249970.1	NC-5	EUA
AF249969.1	NC-2	EUA
AF249968.1	NC-beef	EUA
DQ997620.1	AL	Brasil
AY259042.1	NC-Bahia	Brasil
AY259043.1	NC-Bahia	Brasil
EF219139.1	NC9	EUA
FJ966047.1	NCBovBA5	Brasil
AF338411.1	NC-Nowra	Austrália
FJ966046.1	NCBovBA4	Brasil
FJ966043.1	NCBovBA1	Brasil
EU564167.1	NC-SweB1	Suécia
EU564166.1	NC-Liverpool	Suécia
EU564165.1	NC-Spain1H	Espanha
FJ176222.1	GNCBA2	Brasil
FJ966044.1	NCBovBA2	Brasil
FJ176221.1	GNCBA1	Brasil
AY665718.1	NC-8	EUA
DQ059067.1	--	Brasil
AY665717.1	NC-7	EUA
GQ160477.1	NCsparrowBA3	Brasil
GQ160476.1	NCsparrowBA2	Brasil
AY911517.1	group 10 NCWTD-VA3	EUA
AY911516.1	group 6 NCWTD-VA2	EUA
FJ966045.1	NCBovBA3	Brasil
AY665716.1	NC-6	EUA
AY877364.1	G18	EUA
AY665715.1	NC-1	EUA
AY618485.1	NCBrBuf-4	EUA
AY618484.1	NCBrBuf-3	EUA
AY618482.1	NCBrBuf-1	EUA
AY582109.1	---	EUA
AY618483.1	NCBrBuf-2	EUA
AY618486.1	NCBrBuf-5	EUA
EF446160.1	NC-84	Irã
GQ160475.1	NCsparrowBA1	Brasil
GU194958.1	Clone 256	Austrália
GU194959.1	Clone 260	Austrália
GU194960.1	Clone 259	Austrália


```

I I 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 ]
8888888888 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 ]
I I 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#L49389_MC      -ggaatcttt gactactgt  gatcagggtt  tctatcgaac  cgtctgatac  gaaagtctgt  gcatataccc
#EU564167_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#EF219139_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#DQ997620_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#DQ997619_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#DQ832318_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#AY508811_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#AF249970_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#AF432123_MC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#AF000061_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#AF029702_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#GU194960_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#GU194958_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#FJ176221_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#FJ966046_MC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#AY259042_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#EU564165_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#DQ997618_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#HM229410_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#HM229411_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#HM229412_NC    .....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....  t. ....t.  tt..a....
#EU025025_TG    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#DQ997617_TG    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#DQ997616_TC    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#DQ997615_TC    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#DQ997614_TC    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#EU025024_HH    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#EU025023_HH    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#EF638845_HH    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#EF638844_HH    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#EF638843_HH    g.atatcc.g  cgtctgt.  e--ca.-----  -tat.g...g  .cag-----  -----tg  cagggtacc.g
#DQ997621_NH    g.atat..g  cactact.t.  tcca..cgt.  ctat.ga.cg  .ctgata.tg  a..gctctgtg  catatatac.g
#EU290461_NH    g.atat..g  cactact.t.  tcca..cgt.  ctat.ga.cg  .ctgata.tg  a..gctctgtg  catatatac.g
#AF038859_NH    g.atat..g  cactact.t.  tcca..cgt.  ctat.ga.cg  .ctgata.tg  a..gctctgtg  catatatac.g

```

```

[ 1111111111 11:1111111 111111111 111111112 222222222 222222222 222222222 222222222 222222222 ]
[ 6666666667 777777778 888888889 999999990 000000001 111111112 222222223 333333334 ]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#L49389_NC gggagtgtac ggggaagggga ctctctattg gcaatttaac tcccaggagt tcttccaatg
#EU564167_NC .....
#EF219139_NC .....
#DQ997620_NC .....
#DQ997619_NC .....
#DQ832318_NC .....
#AY508811_NC .....
#AF249970_NC .....
#AF432123_NC .....
#AF030061_NC .....
#AF029702_NC .....
#GU194960_NC .....
#GU194958_NC .....
#FJ176221_NC .....
#FJ966046_NC .....
#AY259042_NC .....
#EU564165_NC .....
#DQ997618_NC .....
#HN229410_NC .....
#HN229411_NC .....
#HN329412_NC .....
#EU025025_TG ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#DQ997617_TG ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#DQ997616_TG ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#DQ997615_TG ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#DQ997614_TG ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#EU025024_NH ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#EU025023_NH ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#EF638844_NH ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#EF638843_NH ...gtgcaca cga.g..c tcaat.tctg a..t.cgtg tctctgt.g .atca.g.ttt c.ag.agt .ct.cagtgt
#DQ997621_NH ...actgttact cga.g..ac tca.tcaatg a..t.a.cg tctctat.g .act..act c.ag.agt .ct.ca.tgt
#EU290461_NH ...agtgtact cga.g..ac tca.tcaatg a..t.a.cg tctctat.g .act..act c.ag.agt .ct.ca.tgt
#AF038859_NH ...agtgtact cga.g..ac tca.tcaatg a..t.a.cg tctctat.g .act..act c.ag.agt .ct.ca.tgt

```



```

| | 333333333 333333333 333333333 333333333 |
| | 222222222 333333334 444444445 |
| | 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 |
| | ctgtatttct ctctatttcg tttcagatta
#L49389_NC .....
#U564167_NC .....
#F219139_NC .....
#D997620_NC .....
#D997619_NC .....
#D932318_NC .....
#A7508811_NC .....
#A7249970_NC .....
#A7432123_NC .....
#A7038861_NC .....
#A7029702_NC .....
#C0101060_NC .....
#C0194950_NC .....
#F0176221_NC .....
#F0956046_NC .....
#A7259042_NC .....
#E0564165_NC .....
#D997618_NC .....
#M229410_NC .....
#M229411_NC .....
#M229412_NC .....
#E025025_TG ...c... ..g..gt...
#D997617_TG ...c... ..g..gt...
#D997616_TG ...c... ..g..gt...
#D997615_TG ...c... ..g..gt...
#D997614_TG ...c... ..g..gt...
#E025024_HI ...c... ..ag..gt...
#E025023_HI ...c... ..ag..gt...
#F638845_HI ...c... ..ag..gt...
#F638844_HI ...c... ..ag..gt...
#F638843_HI ...c... ..ag..gt...
#D997621_HI .....
#E0240461_HI .....
#A7038859_HI .....

```

ANEXO C – Sequências gênicas

Relação de sequências gênicas de *N. caninum* similares as sequências deste estudo, disponíveis no banco mundial de genomas (Genbank), e que foram empregadas na construção da análise filogenética. Estão apresentadas pelo nº de acesso, pelo nome depositado, pela espécie hospedeira, localização geográfica

Nº acesso ao GenBank	Nome	Espécie	Local
L49389.1	--	--	Austrália
AF432123.1	CZ-4	Canídeo	República Tcheca
GU194960.1	Clone 259	Dingos	Austrália
GU194958	Clone 256	Dingos	Austrália
AF029702.1	Swe-B1 strain	--	Suécia
AF038861.1	CN1	--	EUA
DQ832318.1	Brazil	Ovino	Brasil
DQ997619.1	10_06	--	Brasil
AY508811.1	NC-deer1	Cervídeo	EUA
AF249970.1	NC-5	Equino	EUA
DQ997620.1	AL	--	Brasil
DQ997618.1	PR	--	Brasil
AY259042.1	NC-Bahia	--	Brasil
EF219139.1	NC9	Canídeo	EUA
FJ966046.1	NCBovBA4	Bovino	Brasil
EU564167.1	NC-SweB1	Bovino	Suécia
EU564165.1	NC-Spain1H	Bovino	Espanha
FJ176221.1	GNCBA1	Caprino	Brasil