



LEONARDO PEREIRA MESQUITA

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DE
NEOSPORA CANINUM EM CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS**

**LAVRAS – MG
2012**

LEONARDO PEREIRA MESQUITA

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DE *NEOSPORA CANINUM* EM CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS**

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

Orientadora

Dra. Mary Suzan Varaschin

LAVRAS - MG

2012

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

Mesquita, Leonardo Pereira.

Transmissão transplacentária de *Neospora caninum* em cabras naturalmente infectadas/ Leonardo Pereira Mesquita. – Lavras : UFLA, 2012.

124 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Mary Suzan Varaschin.

Bibliografia.

1. Caprinos. 2. Natimorto. 3. Neosporose. 4. Subclasses de IgG.
5. Aborto. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.30896962

LEONARDO PEREIRA MESQUITA

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DE *NEOSPORA CANINUM* EM CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS**

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

APROVADA em 20 de Julho de 2012

Dra. Ana Paula Peconick UFLA

Dr. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo UFV

Dr. Djeison Lutier Raymundo UFLA

Dra. Mary Suzan Varaschin

Orientadora

LAVRAS – MG

2012

Ao meu tio Djalma (*in memoriam*),
dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora.

Aos meus pais, Eduardo e Maria do Carmo, minhas referências incomparáveis.

À Lu, minha irmã e companheira, que apesar da distância sempre esteve comigo em todos os momentos, fáceis ou difíceis.

À minha noiva, Laís, eterna namorada, por estar presente em minha vida e pelos ótimos momentos e viagens intrépidas (“Absolutely curtains”) que vivemos juntos.

Aos meus avós que já se foram, Décio e Célia, insubstituíveis. À minha vó Lia, pela paciência nesses últimos sete anos.

Ao Tio Djalma, por ter sido atencioso durante toda a minha educação e aprendizado. Aos demais tios, tias, primos e primas.

À professora e amiga Mary, pela orientação, paciência, e dificuldades compartilhadas. Ao professor e amigo Pedro, que sempre esteve de prontidão para nos ensinar e aconselhar.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições indispensáveis, especialmente a Ana Paula que nos auxiliou na imunologia.

Aos amigos, Fábio, Tiago e Charles, pelo companheirismo e diversão compartilhados.

Aos estagiários e pós-graduandos do Setor de Patologia (Rafael, Débora, Camila, Karen, Joana), especialmente à Priscila que sempre me acompanhou desde a faculdade, e ao Clayton, que sempre esteve de prontidão para ajudar.

Aos vários amigos e amigas, distantes ou não.

Ao Welson, por manter os laboratórios sempre limpos e agradáveis ao trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Neospora caninum é considerado uma das principais causas de abortos em bovinos. Entretanto, em caprinos, ainda se desconhece a real importância desse parasito. Na primeira parte do estudo, avaliou-se a cinética de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*N. caninum* durante a gestação de 13 cabras soropositivas e duas soronegativas. O anticorpo IgG anti-*N. caninum* também foi avaliado nos conceptos, desde o nascimento dos mesmos até os seis meses de idade. As amostras de soro coletadas mensalmente, tanto nas cabras como nos conceptos, foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI \geq 1:50). Nas 13 cabras soropositivas, os soros também foram submetidos ao teste de ELISA para avaliação de IgG1 e IgG2. A infecção transplacentária (TPI) endógena do feto estava associada a um aumento nos títulos de IgG maternos durante a segunda metade gestacional. Os caprinos que apresentaram este aumento possuem dez vezes mais chances de gerarem conceptos congenitamente infectados. Durante a gestação das cabras soropositivas, observou-se principalmente o predomínio de anticorpos IgG2 (resposta Th1). A taxa de TPI (77%), relativamente alta, sugere a importância da mesma na neosporose em caprinos. Na segunda parte da pesquisa, realizou-se um estudo histopatológico, imuno-histoquímico (IHQ) e molecular nos fetos abortados, natimortos e placentas oriundas das 15 cabras avaliadas. As lesões encontradas nos fetos abortados e natimortos eram caracterizadas principalmente por encefalite não supurativa, sendo que os fetos também apresentaram miocardite e miosite não supurativas. As placentas, da cabra que abortou e de outra que gerou os natimortos, apresentaram principalmente necrose multifocal e infiltrado inflamatório multifocal misto (mononuclear e neutrofílico) ou mononuclear. Tanto os cistos no sistema nervoso central dos fetos e natimortos, como os taquizoítos encontrados no coração e musculatura estriada esquelética de um dos fetos foram positivos na IHQ para *N. caninum*. A presença do DNA de *N. caninum* foi confirmada nos fetos abortados e nos natimortos, assim como nas placentas da cabra que abortou e daquela que gerou natimortos. O DNA de *N. caninum* também foi detectado em sete das onze placentas oriundas das outras cabras soropositivas, sendo que em uma, taquizoítos foram evidenciados pela IHQ para *N. caninum*. Os resultados do presente estudo revelam que o *N. caninum* é um potencial agente causador de problemas reprodutivos em caprinos, cursando com abortos e natimortos, além de ser responsável por importantes alterações imunológicas durante a gestação de cabras naturalmente infectadas.

Palavras chave: Aborto. Cabras. Infecção transplacentária. Natimorto. Neosporose. Subclasses de IgG.

ABSTRACT

Neospora caninum is considered one of the main causes of bovine abortion, being responsible for important alterations in immunologic response during gestation. However, for caprine, the real importance of this parasite is still unknown. In the first part of this study, kinetics of IgG, IgG1 and IgG2 anti-*N. caninum* were evaluated during the gestation of 13 seropositive goats. Two seronegative goats were used as control. The IgG anti-*N. caninum* antibody was also evaluated in the conceptus', from their birth until six months of age. The serum samples collected monthly, both in goats and conceptus', were submitted to indirect fluorescent-antibody test (IFAT \geq 1:50). In the 13 seropositive goats, the sera were also submitted to ELISA test to evaluate IgG1 and IgG2. Endogenous transplacental infection (TPI) in fetuses was associated with an increase in maternal IgG values during the second half of gestation. Goats that presented this increase have ten times more chances of generating congenitally infected conceptus'. During the gestation of seropositive goats, the predominance of IgG2 antibodies (Th1 response) was observed. A relatively high TPI value (77%) observed suggests its importance in caprine neosporosis. In the second part of the research, a histopathological, immunohistochemical and molecular study was conducted in aborted fetuses, stillbirths and placentas of the 15 evaluated goats. Lesions found in aborted fetuses and stillbirths were characterized mainly by non suppurative encephalitis, and the fetuses also presented non suppurative myocarditis and myosistis. The placentas from the goat that aborted and another from the goat that generated stillbirths presented mainly multifocal necrosis and multifocal mononuclear or mixed inflammatory infiltrate (mononuclear and neutrophilic). The cysts in the central nervous system of the fetuses and stillbirths, as well as the tachyzoites found in the heart and striated skeletal muscle of one of the fetuses, were labeled by *N. caninum* immunohistochemistry. The presence of *N. caninum* DNA was confirmed in the aborted fetuses and stillbirths, as well as in placentas of the goat that aborted and in the other that generate stillbirths. *N. caninum* DNA was also detected in seven of the 11 placentas originated of the other seropositive goats, and in one of these, tachyzoites were evidenced by *N. caninum* immunohistochemistry. The results of the present study reveal that *N. caninum* is a potential agent of reproductive problems for caprine, causing abortions and stillbirths, and is also responsible for important immunologic alterations during the gestation of naturally infected goats.

Keywords: Abortion. Goats. Transplacental infection. Stillbirth. Neosporosis. IgG subclasses.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i>	17
----------	--	----

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figura 1	Médias (unidades \pm S.E.M.) dos valores de IgG1 anti- <i>N. caninum</i> avaliados por meio de ELISA, desde o dia 0 até o parto nas cabras que não abortaram, que transmitiram o parasito para a progênie (n=9) ou não (n=3).....	85
Figura 2	Médias (unidades \pm S.E.M.) dos valores de IgG2 anti- <i>N. caninum</i> avaliados por meio de ELISA, desde o dia 0 até o parto nas cabras que transmitiram o parasito para a progênie (n=9) ou não (n=3).....	86
Figura 3	Médias (unidades \pm S.E.M.) dos valores de IgG1 e IgG2 anti- <i>N. caninum</i> das cabras que não abortaram, avaliados por meio de ELISA, desde o dia 0 até o parto.....	87

ARTIGO 2

Figura 1	Neosporose em caprinos. Feto 4, coração, presença de infiltrado inflamatório mononuclear acentuado, entre os miócitos. HE. Barra: 100 μ m.....	121
Figura 2	Neosporose em caprinos. Feto 4, coração, grupo de taquizoítos entre os miócitos e marcados na imuno-histoquímica para <i>N. caninum</i> . Método biotina-estreptavidina-peroxidase, Vector Red [®] . Barra 20 μ m.....	121
Figura 3	Neosporose em caprinos. Natimorto 2, encéfalo, córtex cerebral, área de necrose associada a inflamação mononuclear e células da glia. HE. Barra: 50 μ m.....	122

Figura 4	Neosporose em caprinos. Natimorto 1, encéfalo, colículo rostral, presença de cisto protozoário de parede espessa, não associado a inflamação. HE. Barra: 20 µm.....	122
Figura 5	Neosporose em caprinos. Natimorto 1, encéfalo, colículo caudal, visualiza-se cisto protozoário fortemente marcado na imuno-histoquímica para <i>N. caninum</i> . Método biotina-estreptavidina-peroxidase, Vector Red®. Barra: 50 µm.....	123
Figura 6	Neosporose em caprinos. Cabra 1, placenta, presença de extensa área de necrose, caracterizada por eosinofilia e debris celulares. HE. Barra: 150 µm.....	123
Figura 7	Neosporose em caprinos. Cabra 1, placenta, vilo cório-alantoico, área de necrose envolvendo o mesênquima e trofoblasto. HE. Barra: 100 µm.....	124
Figura 8	Neosporose em caprinos. Em placenta de cabra soropositiva observa-se grupo de taquizoítos no interstício, fortemente marcados na imuno-histoquímica para <i>N. caninum</i> . Método biotina-estreptavidina-peroxidase, Vector Red®. Barra: 20 µm.....	124

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1	Títulos de IgG-anti <i>N. caninum</i> em cabras gestantes, avaliados por meio de RIFI, desde o Dia 0 até o Mês 3 após parto/aborto..	82
Tabela 2	Razões dos valores de IgG2/IgG1 avaliados por meio de ELISA, durante a gestação das 13 cabras soropositivas naturalmente infectadas por <i>N. caninum</i>	83
Tabela 3	Títulos de IgG anti- <i>N. caninum</i> nos conceptos, avaliados por meio de ELISA, desde o nascimento até os 6 meses de idade.....	84

ARTIGO 2

Tabela 4	Intensidade das lesões histopatológicas nos fetos abortados e natimortos.....	118
Tabela 5	Análise histopatológica, molecular e imuno-histoquímica em placentas provenientes de 15 caprinos.....	119
Tabela 6	Análise do sequenciamento genético de amostras positivas na PCR.....	120

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO GERAL..... 12
2	REFERENCIAL TEÓRICO..... 16
2.1	Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i>..... 16
2.2	Patogenia da neosporose e aspectos da transmissão transplacentária..... 19
2.2.1	Imunidade na gestação de animais infectados por <i>N. caninum</i>... 19
2.2.2	Cinética de anticorpos durante a gestação de animais infectados por <i>N. caninum</i>..... 21
2.2.3	Aspectos da transmissão congênita..... 23
2.3	Diagnóstico..... 25
2.3.1	Testes sorológicos..... 25
2.3.2	Análise histopatológica..... 27
2.3.3	Teste de imuno-histoquímica..... 30
2.3.4	Reação em cadeia da polimerase para <i>N. caninum</i>..... 31
2.4	Profilaxia e controle..... 31
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 33
	REFERÊNCIAS..... 34
SEGUNDA PARTE- ARTIGOS	
	ARTIGO 1 “CINÉTICA DE ANTICORPOS EM CABRAS E CONCEPTOS NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>NEOSPORA CANINUM</i>”..... 44
	Resumo..... 44
1	INTRODUÇÃO..... 45
2	MATERIAL E MÉTODOS..... 48
3	RESULTADOS..... 55
4	DISCUSSÃO..... 60
5	REFERÊNCIAS..... 71
	ARTIGO 2 “<i>NEOSPORA CANINUM</i> EM ABORTOS, NATIMORTOS E PLACENTAS DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS NO BRASIL”..... 88
	Resumo..... 88
1	INTRODUÇÃO..... 90
2	MATERIAL E MÉTODOS..... 92
3	RESULTADOS..... 97
4	DISCUSSÃO..... 103
5	REFERÊNCIAS..... 111

PRIMEIRA PARTE
REFERENCIAL TEÓRICO DE *NEOSPORA CANINUM*

1 INTRODUÇÃO GERAL

A neosporose é uma doença parasitária causada pelo protozoário do filo Apicomplexa *Neospora caninum*, parasito intracelular obrigatório e formador de cistos (DUBEY et al., 2002). A doença foi reconhecida pela primeira vez na Noruega, em cães com sintomatologia neuromuscular semelhante àquela relatada na toxoplasmose (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984), e que posteriormente confirmou-se ser causada por um novo agente etiológico, o *N. caninum* (DUBEY et al., 1988).

Atualmente, a neosporose é considerada uma das principais causas de aborto em bovinos em diversos países (DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996). Além do aborto, outras manifestações clínicas relacionadas à doença incluem a morte fetal com posterior reabsorção ou mumificação, natimortos, o concepto pode nascer fraco, morrer após o nascimento, ou então nascer clinicamente normal, mas cronicamente infectado (DUBEY, 2003). Em ruminantes as perdas associadas à neosporose são bastante expressivas, pois além dos abortos, também ocorre gastos com profissionais especializados, estabelecimento do diagnóstico, repetição de cio, e o descarte das vacas soropositivas (DUBEY, 2003).

Em caprinos, no Brasil e em outros países, há poucos relatos de abortos, natimortos ou nascimento de cabritos fracos associados com *N. caninum* (BARR et al., 1992; CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; DUBEY, 2003; ELENI et al., 2004; LINDSAY et al., 1995; VARASCHIN et al., 2012). No Brasil, ao se utilizar diferentes testes sorológicos, pontos de corte e grupos populacionais, a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em caprinos varia de 1,05% a 17,44% (FARIA et al., 2007; FIGLIUOLO et al., 2004; LIMA

et al., 2008; MODOLO et al., 2008; UZÊDA et al., 2007). No sul de Minas Gerais, a soroprevalência de *N. caninum* foi de 10,7%, sendo que as cabras soropositivas têm 3,5 vezes mais chance de abortarem quando comparadas às cabras soronegativas (VARASCHIN et al., 2011). Em outros países a soroprevalência varia de 0,4 a 23,6% (DUBEY; SCHARES, 2011).

Lesões macroscópicas associadas à neosporose são raras, sendo descrito em cabras somente hidrocefalia com hipoplasia de cerebelo (DUBEY et al. 1996), e um quadro de porencefalia caracterizada por áreas com ausência de substância branca cerebral com conseqüente dilatação dos ventrículos laterais pela perda de tecido (hidrocefalia ex-vácuo) (VARASCHIN et al., 2012). As lesões microscópicas visualizadas na neosporose são úteis para o diagnóstico da enfermidade e consistem principalmente de encefalite não supurativa associada ou não a áreas de necrose, focos de gliose e manguitos perivascularares, e no coração e musculatura estriada esquelética pode ser observado infiltrado inflamatório não supurativo (DUBEY; LINDSAY, 1996). Entretanto, as lesões causadas pelo *N. caninum* são semelhantes àquelas observadas na toxoplasmose, doença esta importante em caprinos, exigindo a utilização de técnicas diagnósticas mais específicas tais como a imuno-histoquímica (CORBELLINI et al., 2002; PESCADOR et al., 2007) e/ou provas moleculares (DUBEY; BUXTON; WOUDA; 2006; MORENO et al., 2012). A imuno-histoquímica, amplamente utilizada como método de diagnóstico, permite uma melhor visualização das estruturas parasitárias nos tecidos, sendo também, extremamente importante nas fases iniciais e/ou em lesões discretas, como foi descrito por Barr et al. (1990) e Corbellini et al. (2002). No entanto, a imuno-histoquímica quando comparada a PCR apresentou menor sensibilidade em tecidos oriundos de fetos bovinos (VAN MAANEN, et al., 2004).

Diversos estudos em bovinos demonstram importantes alterações nos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* na gestação de animais naturalmente infectados (ALMERÍA et al., 2009; ANDRIANARIVO et al., 2005; GUY et al., 2001; HÄSLER et al., 2006; NOGAREDA et al., 2007; PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1996; STENLUND et al., 1999). Nogareda et al. (2007) demonstra que durante a gestação pode haver um aumento ou uma produção constante de anticorpos na segunda metade gestacional nas vacas que não abortaram e no período anterior ao aborto nas vacas que abortaram. Em bovinos, aumentos significativos nos títulos de anticorpos principalmente a partir da segunda metade gestacional, sugerem fortemente a recrudescência do parasito e os mesmos estão relacionados com a transmissão congênita (PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1996; GUY et al., 2001). A infecção congênita é geralmente aceita como o meio principal de transmissão e manutenção do *N. caninum* em rebanhos bovinos (HIETALA; THURMOND, 1999), sendo que em alguns rebanhos pode atingir até 95% dos conceptos (DAVISON; OTTER; TREES, 1999). O aumento nos títulos de anticorpos anti-*N. caninum*, associados à transmissão congênita, estão relacionados principalmente com maiores valores da subclasse IgG2 (ANDRIANARIVO et al., 2005; GUY et al., 2001). A resposta do tipo Th1, mediada pelo interferon-gamma (IFN- γ), importante para o controle de patógenos intracelulares, como no caso do *N. caninum* pode ser prejudicial à gestação, podendo resultar no aborto (INNES et al., 2005; QUINN et al., 2002). Entretanto, em bovinos naturalmente infectados, a produção predominante de IgG2 anti-*N. caninum*, associada ao IFN- γ , resposta do tipo Th1 em bovinos, foi protetora contra a ocorrência o aborto (ALMERÍA et al., 2009). Em cabras experimentalmente infectadas por *N. caninum* no início da gestação, a infecção e doença clínica foram semelhantes àquelas observadas em bovinos naturalmente

infectados (LINDSAY et al., 1995). Nestas cabras experimentalmente infectadas, foram detectados picos nos títulos de IgG anti-*N. caninum*, avaliados por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), variando de 1:6400 a 1:25600 após 4 a 5 semanas de inoculação, sendo observado um decréscimo para 1:3200, 16 semanas após a inoculação (LINDSAY et al., 1995). Entretanto, até o presente momento, não há estudos a respeito da dinâmica de anticorpos anti-*N. caninum* em cabras e conceptos naturalmente infectados por *N. caninum*, bem como a relação desta dinâmica com aspectos patogênicos e de infecção congênita.

O objetivo com este trabalho é avaliar a cinética de IgG, IgG1 e IgG2 anti-*N. caninum* em cabras gestantes naturalmente infectadas por *N. caninum* e de IgG anti-*N. caninum* nos respectivos conceptos até os seis meses de idade, bem como buscar possíveis relações desta dinâmica de anticorpos nas cabras com os aspectos da infecção congênita e ocorrência de problemas reprodutivos. Serão avaliados também, os aspectos histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares em abortos, natimortos e placentas oriundas das cabras naturalmente infectadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ciclo de vida de *Neospora caninum*

N. caninum pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, subordem Eimeriina e família Sarcocystidae, igualmente aos gêneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* e *Besnoitia* (DUBEY et al., 1988). Genericamente, *N. caninum* é muito semelhante estruturalmente e no seu ciclo de vida ao *Toxoplasma gondii*, no entanto a neosporose é considerada uma doença primariamente de bovinos e cães, ao passo que a toxoplasmose primariamente acomete humanos, ovinos e caprinos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

No ciclo de vida do parasito estão presentes três estágios infecciosos típicos: oocistos, taquizoítos e cistos teciduais (Figura 1). Os cistos teciduais e taquizoítos são encontrados nos hospedeiros intermediários e podem ocorrer intracelularmente (DUBEY et al., 2002). Os cistos de *N. caninum* são encontrados primariamente no tecido nervoso, possuem formato arredondado a ovalado, são revestidos por uma parede espessa que pode chegar até 4 μm , e são preenchidos por bradizoítos medindo aproximadamente 8x2 μm , caracteristicamente alongados e com um núcleo subterminal (DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos são ovoides, lunares ou globulares, e medem, dependendo do estágio de divisão de 3-7 x 1-5 μm e dividem-se em dois zoítos por endodigenia. Em animais infectados, os taquizoítos podem ser encontrados em diversas células tais como células do sistema nervoso central, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células tubulares renais e hepatócitos (DUBEY; LINDSAY, 1996).

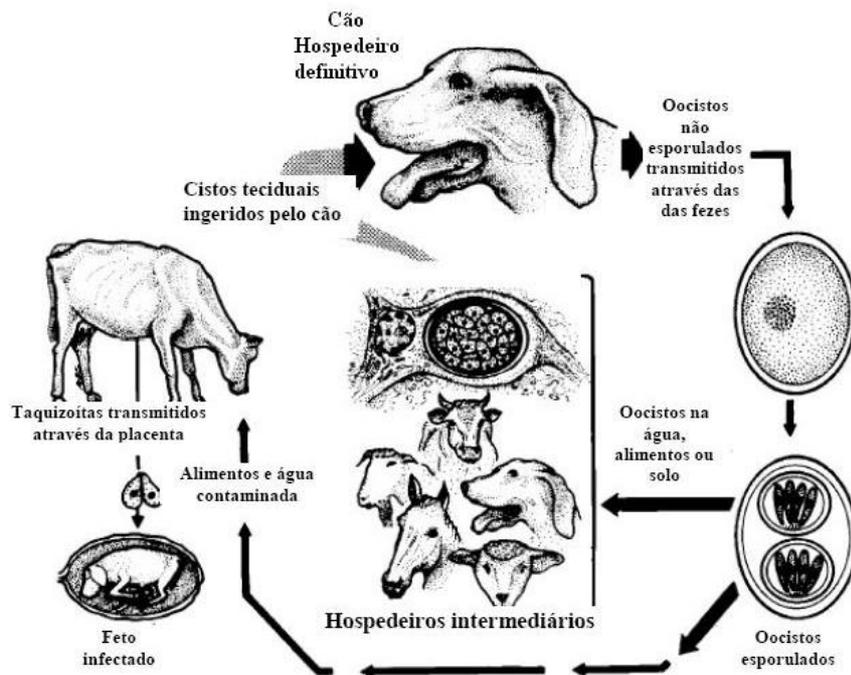


Figura 1 – Ciclo de vida *N. caninum*. Adaptado de Dubey (2003).

Os hospedeiros definitivos conhecidos para *N. caninum* são o cão (*Canis familiaris*) (McALLISTER et al., 1998), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo-cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). Estes hospedeiros definitivos provavelmente tornam-se infectados ao ingerirem tecidos contendo bradizoítos (DIJKSTRA et al., 2001; McALLISTER et al., 1998) e, conseqüentemente, eliminam oocistos não esporulados nas fezes, e que no meio ambiente se tornam esporulados (DUBEY et al., 2002). Os hospedeiros intermediários, principalmente os herbívoros, tornam-se infectados ao ingerirem alimento e água contaminados com oocistos esporulados de *N. caninum* (DUBEY; SCHARES;

ORTEGA-MORA, 2007). A infecção transplacentária pode ocorrer quando os taquizoítos são transmitidos de um animal infectado para seu feto durante a gestação (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Em bovinos, o *N. caninum* é transmitido muito eficientemente, e tanto a transmissão horizontal como a vertical são consideradas importantes na epidemiologia da neosporose (DUBEY; BUXTON; WOUUDA, 2006). Recentemente, os termos transmissão transplacentária endógena e transmissão transplacentária exógena tem sido propostos para descrever com mais precisão no que diz respeito à rota de infecção (TREES; WILLIAMS, 2005). A transmissão transplacentária exógena ocorre após uma infecção primária, por meio da ingestão de oocistos, em um animal gestante, ao passo que a transmissão transplacentária endógena ocorre em um animal cronicamente infectado, após a reativação (recrudescência) da infecção durante a gestação (TREES; WILLIAMS, 2005). Assim como a transmissão transplacentária exógena, a transmissão endógena pode levar ao aborto, mas na maioria dos casos, em bovinos, o bezerro nasce saudável, porém congenitamente infectado (DAVISON; OTTER; TREES, 1999; PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1996). Em bovinos as taxas de transmissão transplacentária podem variar de 81% (PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1996) a 95% (DAVISON; OTTER; TREES, 1999). Embora a transmissão horizontal seja importante em bovinos, geralmente é aceito que a infecção congênita é o principal meio de transmissão e manutenção do *N. caninum* em rebanhos bovinos (HIETALA; THURMOND, 1999). Em ovinos experimentalmente infectados a transmissão vertical ocorreu através de sucessivas gerações (SILVA, 2005). Em caprinos naturalmente infectados, sabe-se que a transmissão transplacentária pode ocorrer (BARR et al., 1992; CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; DUBEY, 2003;

ELENI et al., 2004; LINDSAY et al., 1995; VARASCHIN et al., 2012) e que uma taxa média de 31,8% de transmissão vertical foi observada em caprinos através de sucessivas gerações (ALTBUCH et al., 2012). Entretanto, a importância deste tipo de infecção ainda permanece incerta.

2.2 Patogenia da neosporose e aspectos da transmissão transplacentária

2.2.1 Imunidade na gestação de animais infectados por *N. caninum*

A patogenia da neosporose, a qual é extensivamente estudada em bovinos, ainda não está totalmente elucidada. Eventos chave na patogênese da neosporose envolvem a reativação da infecção latente, o período de ocorrência e severidade da parasitemia na gestação (INNES et al., 2001). Na gestação, há uma considerável imunomodulação, para que a mãe possa carregar o “enxerto alógeno”, ou seja, o feto, e levar a gestação adiante (RAGHUPATHY, 1997). Estudos a respeito da regulação de citocinas na gestação sugerem que a resposta Th1, regulada por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-12 e TNF- α , importantes no controle de patógenos intracelulares, é negativamente regulada durante a gestação em comparação à resposta Th2, na qual as citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β são produzidas (WEGMANN et al., 1993). Em murinos, as células Th1 produzem IFN- γ , IL-2 e TNF- β (linfotóxina B), as quais são responsáveis por promoverem uma resposta imune contra patógenos intracelulares (resposta Th1), e mudança de subclasse para IgG2, ao passo que as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, as quais são fundamentais para a produção de anticorpos (resposta Th2) e mudança de subclasse para IgG1 (MOWEN; GLIMCHER, 2004; SZABO et al., 2003). Semelhantemente, em bovinos, a

resposta imune do tipo Th1, associada à secreção de IFN- γ , induz a produção da subclasse IgG2 (ESTES; CLOSSER; ALLEN, 1994), ao passo que as células Th2, as quais secretam IL-4, induzem a produção de IgG1 (ESTES et al., 1995).

A habilidade de bovinos em montar uma resposta imune celular específica e mediada por IFN- γ , a qual é importante para o controle de parasitos intracelulares, como no caso do *N. caninum*, decresce significativamente por volta da metade gestacional (INNES et al., 2001). Essa modulação da resposta mediada por IFN- γ , observada na metade gestacional em vacas experimentalmente infectadas, pode influenciar a recrudescência de uma infecção persistente prévia causando a liberação de bradizoítos resultando em parasitemia (INNES et al., 2001).

Para que o aborto ocorra, o feto ou placenta tem que ser danificados, de maneira que não são mais viáveis (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Geralmente é aceito que o aborto na neosporose ocorra devido a uma inversão de uma imunidade do tipo Th2, a qual é favorável a manutenção da gestação, para uma resposta do tipo Th1 excessiva (INNES et al., 2005). Embora o IFN- γ seja um importante componente da imunidade protetora contra o *N. caninum*, este tipo de resposta ocorrendo na placenta pode ser prejudicial à gestação (INNES et al., 2002). No entanto, em estudo em vacas naturalmente infectadas por *N. caninum*, observou-se que a resposta mediada por IgG2, associada a produção de IFN- γ (Th1), foi protetora contra a ocorrência do aborto (ALMERÍA et al., 2009). Semelhantemente, em bovinos experimentalmente infectados durante a gestação, observou-se uma resposta principalmente mediada por IgG2, com aumento da resposta imune celular e produção de IFN- γ , indicativos de uma resposta do tipo Th1 (WILLIAMS et al., 2000). Em bovinos naturalmente infectados por *N. caninum*, o aumento nos valores de anticorpos

anti-*N. caninum* estavam fortemente associados a uma reativação de uma infecção latente, e predominantemente associados à resposta mediada por IgG2 (ANDRIANARIVO et al., 2005; GUY et al., 2001).

O período de infecção placentária e fetal durante a gestação são fatores determinantes na ocorrência do aborto. Evidências geradas por estudos em bovinos experimentalmente infectados indicam que quanto mais cedo na gestação ocorrer a parasitemia, mais severas serão as consequências para o feto (MACALDOWIE et al., 2004). Um feto muito novo não tem um sistema imune desenvolvido suficientemente para controlar a multiplicação parasitária nos tecidos, ao passo que um feto mais desenvolvido está mais apto a limitar o crescimento parasitário e favorece o desenvolvimento de cistos teciduais e infecção persistente (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Portanto no primeiro trimestre de gestação em bovinos, o feto é excepcionalmente vulnerável à infecção por *N. caninum*, e muito provavelmente não sobrevive. Ao passo que fetos, no terceiro trimestre de gestação, podem montar uma resposta imune (INNES et al., 2005), o que pode ser suficiente ou não para salvá-lo (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006).

2.2.2 Cinética de anticorpos durante a gestação de animais infectados por *N. caninum*

Em bovinos naturalmente infectados por *N. caninum*, observou-se um aumento significativo nos valores de IgG durante a gestação, principalmente a partir da segunda metade gestacional (GUY et al., 2001; PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1997; STENLUND et al., 1999). Segundo Dubey (2003), bovinos soropositivos para *Neospora caninum* são mais propensos a abortar do que os

bovinos soronegativos, ocorrendo um aumento no título de anticorpos 4 a 5 meses antes do parto. Vacas, que durante a gestação mantiveram altos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* e que tiveram um aumento entre os 90 e 240 dias de gestação são mais propensas a gerarem conceptos congenitamente infectados se comparadas com as vacas que não tiveram esse aumento ou aquelas que mantiveram baixos títulos de anticorpos (PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1997). Semelhantemente, os aumentos nos títulos de anticorpos na segunda metade gestacional, estavam relacionados com a ocorrência da transmissão transplacentária (GUY et al., 2001). Aumentos significantes nos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* no último trimestre de gestação também são relatados (HÄSLER et al., 2006). Neste estudo longitudinal, Häsler et al. (2006) verificaram que das 30 vacas soropositivas, 28 permaneceram soropositivas durante toda a gestação, e duas testaram negativas pelo menos uma vez durante a gestação.

Em ovelhas experimentalmente infectadas durante a gestação, títulos de IgG e IgM para *N. caninum* foram detectados pela RIFI no soro dos fetos provenientes destas ovelhas (BUXTON et al., 1997). Os valores fetais da IgM foram maiores 25 dias após a inoculação (1:256 e 1:512), ocorrendo uma queda após 40 dpi (1:16 a 1:128), 53 dpi (1:8 a 1:128), estes últimos semelhantes aos títulos controles. Os títulos da IgG foram: 25 dpi (1:64 a 1:128), 40 dpi (1:128 a 1:512), e aos 53 dpi (1:64 a 1:256), significativamente maiores que os controles. Isto demonstrando uma resposta fetal ao parasito (BUXTON et al., 1997). Nas ovelhas, ao final da segunda semana após a infecção, a média geométrica da IgG era um título de 128 (104 dias de gestação). Este aumentou a um pico de 1024 na quarta semana (118 dias de gestação) e passou a declinar com valores entre

256 e 512 após 8 semanas pós-infecção (146 dias de gestação) (BUXTON et al., 1997).

Em cabras experimentalmente infectadas durante a gestação, houve um aumento, que variou de 1:6400 a 1:25600, nos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* após 4 a 5 semanas de inoculação (LINDSAY et al., 1995). Na segunda gestação destas cabras experimentalmente infectadas, sem que houvesse a inoculação, os títulos, nas coletas realizadas, variaram entre 1:400 e 1:3200 (LINDSAY et al., 1995).

2.2.3 Aspectos da transmissão congênita

Embora, vários eventos imunológicos ocorram durante a gestação de bovinos naturalmente e experimentalmente infectados, geralmente as taxas de transmissão transplacentária são altas. Taxas de infecção congênita, com valores de 69,2% (HEIN et al., 2012), 75% (HALL; REICHEL; ELLIS, 2005), 81% (PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1996), 94% (SCHARES et al., 1998), e 95% (DAVISON; OTTER; TREES, 1999) têm sido observadas em bovinos naturalmente infectados. No Brasil, taxas menores (24%) têm sido relatadas em bovinos (OLIVEIRA et al., 2010).

Em um estudo epidemiológico de transmissão vertical de neosporose em bovinos leiteiros realizado por Anderson et al. (1997), bezerros soropositivos na pré-colostragem, com títulos pela RIFI $\geq 1:5120$ e que posteriormente quando adultos, tiveram filhos soropositivos, quando do período do parto o título dessas novilhas tinha caído para valores variando entre 1:80 e 1:1280. Entretanto não foi feito um acompanhamento do título desses animais entre seu nascimento e a sua primeira parição, conforme questionou Schares et al. (1998).

Em seis famílias de bovinos, sendo que três delas com casos de abortos demonstraram que 14 (93%) dos 15 descendentes de dez vacas soropositivas também eram soropositivos para *N. caninum* (SCHARES et al., 1998). Os resultados obtidos por estes autores (SCHARES et al., 1998) sugerem que a infecção por *N. caninum* pode ser mantida por várias gerações a um nível próximo de prevalência constante, aparentemente sem a necessidade de dispersão por um hospedeiro definitivo. Entretanto, a observação, de que uma vaca soronegativa teve um bezerro soropositivo para *N. caninum* juntamente com duas crias soronegativas poderia ser uma indicação que neste caso a infecção pós-natal ocorreu (SCHARES et al., 1998). Alguns autores especulam que o bovino poderia se tornar infectado oralmente através da ingestão de tecidos infectados (como por exemplo, placenta) (SCHARES et al., 1998).

Em sete ovinos experimentalmente infectados por *N. caninum*, a transmissão do parasito foi confirmada através de sucessivas gerações, sendo de 15 conceitos gerados, 12 eram clinicamente normais (SILVA, 2005).

Diante destes resultados, a infecção congênita é geralmente aceita como o meio principal de transmissão e manutenção do *N. caninum* (HIETALA; THURMOND, 1999). Em caprinos, há somente um estudo em animais naturalmente infectados, que demonstra taxa média de 31,8% de transmissão vertical através de sucessivas gerações (ALTBUCH et al., 2012). No entanto, para caprinos, a importância do *N. caninum* como agente que é transmitido através da placenta, ou como responsável por alterações imunológicas significativas na gestação de cabras naturalmente infectadas, ainda não é completamente conhecida.

2.3 Diagnóstico

2.3.1 Testes sorológicos

A partir do primeiro isolamento de *N. caninum*, testes sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação de *Neospora* (TAN) e vários testes do ensaio imunossorbente ligados às enzimas (ELISA), foram desenvolvidos para o diagnóstico em cães, bovinos e outros animais potencialmente hospedeiros (ATKINSON et al., 2000). A RIFI foi o primeiro teste utilizado para demonstração de anticorpos anti-*N. caninum*, sendo considerado de referência (“gold standard”) quando outros ensaios são comparados (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

Na RIFI, como antígenos, são utilizados taquizoítos íntegros e o teste detecta anticorpos direcionados para antígenos presentes sobre a superfície do parasita. Nas espécies do filo Apicomplexa, os antígenos de membrana são considerados mais específicos que os componentes intracelulares (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999). Os valores dos pontos de corte para RIFI são variáveis, e não é possível estabelecer valores iguais para diferentes laboratórios, uma vez que os resultados dos testes são muito dependentes da qualidade do equipamento utilizado na microscopia de fluorescência (DUBEY; SCHARES, 2006). Consequentemente, um valor de um ponto de corte adequado para um laboratório em particular, pode não ser aplicável para outro. Em bovinos geralmente se utilizam pontos de corte de 1:160 a 1:640 (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999), ao passo que em caprinos variam de 1:50 a 1:100 (UZÊDA et al., 2007; VARASCHIN et al., 2011).

Levantamentos sorológicos, tem sido realizados em várias partes do Brasil. A frequência obtida nos rebanhos estudados no sul de Minas Gerais foi de 10,7% (VARASCHIN et al., 2011), sendo esta, maior que aquelas relatadas por outros autores que utilizaram a mesma metodologia para *N. caninum*, como 1,05% em 381 caprinos testados no município de Mossoró, RN (LIMA et al. 2008). Em Patos, PB, de 306 soros coletados em um abatedouro a soroprevalência foi de 3,3% (FARIA et al. 2007). No estado de São Paulo, em 394 cabras testadas a soropositividade foi de 6,34%, (FIGLIUOLO et al. 2004). Por outro lado, Modolo et al. (2008), no estado de São Paulo, em 923 cabras de leite, observaram uma positividade de 17,44%, por meio do teste de TAN, entretanto o ponto de corte utilizado foi de 1:25. No estado da Bahia, valores maiores ao do presente estudo foram obtidos, onde de 384 cabras testadas, 15% foram reagentes (RIFI \geq 1:100) ao *N. caninum* (UZÊDA et al. 2007).

A titulação de vacas que tiveram fetos soropositivos para *N. caninum* e com lesões histológicas é descrita por vários autores (BARR et al., 1995; SCHARES et al., 1998). Através da RIFI, são observadas titulações de 1:800, 1:100 (SCHARES et al., 1998) e 1:400 (BARR et al., 1995). Já para o feto, alguns pesquisadores consideram como pontos de corte 1:80 (BARR et al., 1995) e 1:25 (WOUDA; DUBEY; JENKINS, 1997), como específicos para a sorologia fetal. Por outro lado, títulos na pré-colostragem de bezerros infectados por via transplacentária, mas nascido saudáveis são usualmente altos e podem ser maiores ou iguais a 1:1240 (ANDERSON et al., 1997).

Vários testes de ELISA têm sido descritos para detectar anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos. Estes testes utilizam taquizoítos íntegros de *N. caninum*, extratos totais de taquizoítos solúveis em água ou detergente, antígenos únicos ou recombinantes (DUBEY; SCHARES, 2006). A maioria dos

testes comerciais para detecção de anticorpos específicos contra *N. caninum* utiliza antígenos baseados em lisados de taquizoítos (DUBEY; SCHARES, 2006). O ELISA também têm sido utilizado em bovinos, na detecção dos subtipos de IgG (IgG1 e IgG2) anti-*N. caninum* para verificar a relação da cinética dos mesmos com a ocorrência de aborto (ALMERÍA et al., 2009). Poucos testes de ELISA foram desenvolvidos para caprinos (NAGULESWARAN et al., 2004). No entanto, recentemente, estudos de soroprevalência de *N. caninum* em caprinos utilizaram teste de ELISA comercial CHEKIT* *Neospora caninum* (CZOPOWICZ ET AL., 2011; IOVU et al., 2011). Ao apresentar 100% de correlação positiva com o teste da RIFI (CZOPOWICZ et al., 2011), que é considerado padrão ouro (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999), o CHEKIT* *Neospora caninum* demonstrou bons resultados para detecção de anticorpos em caprinos. Na Polônia, através da utilização deste kit comercial, detectaram-se uma prevalência de 9% em nível de rebanho (CZOPOWICZ et al., 2011). Na Romênia, 2,3% dos caprinos foram positivos para o *N. caninum* através da utilização do CHEKIT* *Neospora caninum* (IOVU et al., 2011).

2.3.2 Análise histopatológica

As lesões placentárias são tipicamente restritas aos cotilédones e consistem de áreas focais de necrose e inflamação não supurativa, onde os bradizoítos podem estar presentes no trofoblasto (BARR et al., 1990; BARR et al., 1991).

As lesões microscópicas são muito utilizadas no diagnóstico do aborto por *N. caninum*. Os órgãos de eleição para o diagnóstico histopatológico são

cérebro, coração, fígado (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; PETERS et al., 2001) e músculo esquelético (DUBEY; LINDSAY, 1996; CORBELLINI et al., 2002).

As lesões histopatológicas causadas pelo *Neospora caninum* em várias espécies animais são caracterizadas por infiltrados de células inflamatórias, compostos basicamente por mononucleares, que podem ser encontradas em vários órgãos dos fetos abortados, principalmente no sistema nervoso central, coração, músculo esquelético e fígado (DUBEY; LINDSAY, 1996; CORBELLINI et al., 2002), associadas a áreas multifocais de necrose (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003) e gliose (DUBEY; LINDSAY, 1996; WOUDA; DUBEY; JENKINS, 1997)

No sistema nervoso central, a distribuição das lesões é descrita 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; HELMAN et al., 1998) e mangitos perivascularares multifocais (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998). Ocasionalmente pode ocorrer encefalomielite em bezerros congenitamente infectados (BARR et al., 1991; DUBEY, 2003).

No coração se observa miocardite não supurativa moderada a acentuada (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998) e as lesões hepáticas

consistem de infiltrado mononuclear periportal e focos de necrose hepatocelular associado com trombose intrassinusoidal (BARR et al., 1990).

O músculo esquelético é frequentemente afetado, sendo observado infiltrado mononuclear multifocal (BARR et al., 1990; CORBELLINI et al., 2001; PESCADOR et al., 2007).

Poucas estruturas parasitárias são observadas na coloração de hematoxilina e eosina (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 1996; PESCADOR et al., 2007). A ocorrência de cistos são descritos somente no cérebro, medula espinhal (BARR et al., 1990; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 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).

Segundo Collantes-Fernández et al. (2006) 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 parasitas poderia infectar o feto, em função de uma resposta imune ineficiente para controlar sua multiplicação. Ao passo que em abortos endêmicos, os quais ocorrem em bovinos cronicamente infectados, após a reativação de cistos parasitários latentes, e com certa imunidade ao parasito, a imunidade da vaca reduziria a invasão parasitária e números menores de parasitas infectariam o feto. Os autores também sugerem uma disseminação sistêmica de *N. caninum* em fetos provenientes de aborto epidêmicos, devido ao DNA deste ter sido frequentemente identificado em mais de um órgão, no qual 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.

2.3.3 Teste de imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica, amplamente utilizada como método de diagnóstico da neosporose em tecidos com lesões, pode chegar a mais de 80% de resultados positivos (CORBELLINI et al., 2002). Esta técnica permite uma melhor visualização das estruturas parasitárias nos tecidos, sendo também, extremamente importante nas fases iniciais e/ou em lesões discretas, como foi descrito por Barr et al. (1990) e Corbellini et al. (2002). Segundo Dubey (2003) a demonstração por imuno-histoquímica do *N. caninum* nas lesões é atualmente a melhor evidência para caracterizar a etiologia do aborto.

Uma vez que a manifestação do aborto é mais frequente nas fases mais avançadas da gestação (LÓPEZ-GATIUS; PABÓN; ALMERÍA, 2004), a imuno-histoquímica permitiria uma visualização precoce do parasito nos tecidos, sendo assim, uma das formas de caracterizar a transmissão congênita de *N. caninum*. É descrita como uma técnica de alta especificidade, porém menos sensível se comparada a PCR (VAN MAANEN et al., 2004).

Um dos anticorpos mais frequentemente utilizados e com resultados positivos é o anti-*N. caninum* (Veterinary Medical Research Development, Pullman, USA) (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998), associado a técnica streptavidina-biotina, que é frequentemente descrita como tendo resultados positivos (CORBELLINI et al., 2002; PESCADOR et al., 2007; VARASCHIN et al., 2012).

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

geralmente não estão associados às lesões (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998).

2.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase para *N. caninum*

As técnicas de diagnóstico molecular, baseadas na detecção de porções do genoma de *N. caninum* ofereceram a possibilidade de superar problemas de diagnóstico, principalmente no que se refere à sensibilidade insuficiente (PAYNE; ELLIS, 1996). A partir da década de 1990, várias foram as estratégias desenvolvidas no sentido de melhorar a sensibilidade e especificidade do teste, destacando-se as técnicas de PCR simples e “Nested” (ELLIS, 1998), testes de hibridização de DNA (MULLER et al, 1996), “multiplex” PCR (MESECK et al., 2005) e “real-time” PCR (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

Grande parte do genoma de *N. caninum* ainda não foi sequenciada, e praticamente todos os trabalhos que desenvolveram PCRs para diagnóstico e filogenia partiram de sequências altamente conservadas nos eucariotos, marcadamente a região gênica codificadora de RNA ribossomal ITS 1 (PAYNE; ELLIS, 1996) e a região denominada de NC-5 (YAMAGE; FLECHTNER; GOTTSTEIN, 1996), sendo necessária a confirmação por sequenciamento genético (PAYNE; ELLIS, 1996; YAMAGE; FLECHTNER; GOTTSTEIN, 1996).

2.4 Profilaxia e controle

Programas de controle da neosporose têm sido realizados em diversos países tanto em níveis nacionais, como regionais e locais. Estes programas

incorporam cálculos de custo-benefício, comparando as despesas oriundas das medidas de controle com os benefícios da redução de perdas decorrentes da infecção por *N. caninum* ou abortos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Em rebanhos bovinos, nos quais há infecção por *N. caninum*, os programas de controle são baseados na diminuição da transmissão vertical no rebanho por meio da redução do número de bovinos soropositivos e/ou diminuindo o risco da transmissão horizontal do parasito principalmente por meio do controle da população dos hospedeiros definitivos, os quais são fontes de contaminação pela excreção de oocistos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Nos rebanhos, nos quais a prevalência é baixa e a transmissão vertical prevalece, seria prudente não incluir os animais soropositivos na reprodução, assim, diminui-se a quantidade de animais soropositivos no rebanho por meio do bloqueio da transmissão vertical. Os animais soropositivos podem gradualmente serem descartados a medida que a produção de leite dos mesmos vai decrescendo (HALL; REICHEL; ELLIS, 2005). A transmissão horizontal pode ser evitada, principalmente por meio do controle do acesso de cães à fonte de alimento dos bovinos, além de evitar que cães e bovinos tenham acesso a fontes de infecção tais como placentas e carcaças de bovinos (HALL; REICHEL; ELLIS, 2005).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados e as observações do presente estudo indicam que nas cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, a infecção transplacentária endógena do feto estava associada a um aumento nos títulos de IgG maternos durante a segunda metade gestacional. Os caprinos que apresentaram este aumento possuem 10 vezes a mais de chances de gerarem conceptos congenitamente infectados. Durante a gestação das cabras soropositivas, observou-se principalmente o predomínio de anticorpos IgG2 (resposta Th1), embora padrões mistos e um padrão IgG1 também tenham sido observados. A taxa de transmissão (77%) relativamente alta sugere a importância da TPI na neosporose em caprinos, tornando os conceptos saudáveis potencialmente transmissores do parasito para gerações futuras.

A ocorrência de problemas reprodutivos relacionados a neosporose em 15,38% das cabras soropositivas, sugere-se que o *N. caninum* é um potencial agente causador de abortos e natimortos em caprinos, cursando com lesões severas nos fetos, natimortos e placenta. Adicionalmente, os resultados aqui apresentados ressaltam a importância da utilização de mais de uma ferramenta diagnóstica para detecção do parasito, principalmente em placentas, como no caso da PCR e imuno-histoquímica.

REFERÊNCIAS

ALMERÍA, S. et al. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 35-42, Jan. 2009.

ALTBUCH, J. A. et al. *Neospora caninum*: a successful testing and eradication program in a dairy goat herd. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 105, n. 1/3, p. 341-344, June 2012.

ANDERSON, M. L. et al. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 202, n. 1, p. 113-117, Feb. 1997.

ANDRIANARIVO, A. G. et al. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitology Research**, Berlin, v. 96, n. 1, p. 24-31, Apr. 2005.

ATKINSON, R. et al. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 110-114, Jan. 2000.

BARR, C. B. et al. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 27, n. 5, p. 354-361, 1990.

_____. Diagnosis of bovine foetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, London, v. 137, n. 24, p. 611-613, Dec. 1995.

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

_____. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 28, n. 1, p. 110-116, 1991.

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

BJÖRKMAN, 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. et al. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 117, n. 1, p. 1-16, Mar. 1997.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, 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. 2, p. 187-191, Apr. 2006.

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

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 2, p. 195-202, Apr. 2002.

CZOPOWICZ, M. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 3/4, p. 339-341, June 2011.

DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TRESS, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, Oct. 1999.

DIJKSTRA, T. et al. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 747-752, June 2001.

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

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

DUBEY, J. P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 2/4, p. 382-387, Sept. 2011.

_____. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 208, n. 2, p. 263-265, Jan. 1996.

_____. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 193, n. 9, p. 1269-1283, May 1988.

_____. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 929-946, July 2002.

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

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

_____. Neosporosis in animals-the last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 1, p. 90-108, Jan. 2011.

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

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

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

ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN- γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. **Cellular Immunology**, New York, v. 154, n. 2, p. 287-295, Apr. 1994.

ESTES, D. M. et al. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in vitro*. **Cellular Immunology**, New York, v. 163, n. 2, p. 268-279, July 1995.

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

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

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 159-161, Mar. 2004.

GUY, C. S. et al. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection in associated with an acute increase in maternal antibody. **Veterinary Record**, London, v. 149, n. 15, p. 443-449, Oct. 2001.

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.

HÄSLER, B. et al. *Neospora caninum*: serological follow-up in dairy cows during pregnancy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 222-230, Apr. 2006.

HEIN, H. E. et al. Neosporose bovina: avaliação da transmissão vertical e fração atribuível de aborto em uma população de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 396-400, 2012.

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.

HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, Oct. 1999.

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

_____. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 497-504, Nov. 2002.

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

IOVU, A. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy goats from Romania. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, n. 3/4, p. 470-474, May 2012.

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

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

LINDSAY, D. S. et al. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 9, p. 1176-1180, Sept. 1995.

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

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.

MACALDOWIE, C. et al. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 131, n. 1, p. 142-156, Feb. 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.

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

MODOLO, J. R. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 597-600, dez. 2008.

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

MOWEN, K. A.; GLIMCHER, L. H. Signaling pathways in Th2 development. **Immunological Reviews**, Munksgaard, v. 202, n. 1, p. 203-222, Dec. 2004.

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

NAGULESWARAN, A. et al. Elaboration of a crude antigen ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of *Neospora caninum*-specific antibodies in goats from Sri Lanka. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 257-262, Dec. 2004.

NOGAREDA, C. et al. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3/4, p. 193-199, Sept. 2007.

OLIVEIRA, V. S. F. et al. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in a embryo transfer center. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 3/4, p. 206-210, Oct. 2010.

PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 60, n. 1, p. 133-139, Feb. 1996.

_____. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 1, p. 82-87, Jan. 1997.

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.

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

QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. A cause of immune-mediate failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 391-394, Sept. 2002.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, Cambridge, v. 18, n. 10, p. 478-482, Oct. 1997.

SCHARES, G. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 87-98, Feb. 1998.

SILVA, C. H. S. e. **Estudo da transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas deslanadas**. 2005. 54 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

STENLUND, S. et al. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 85, n. 4, p. 227-234, Sept. 1999.

SZABO, S. J. et al. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. **Annual Reviews Immunology**, Palo Alto, v. 21, p. 713-758, 2003.

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

UZÊDA, R. S. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 70, n. 2/3, p. 257-259, July 2007.

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

_____. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais.

Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 53-58, jan. 2011.

WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T_H2 phenomenon? **Immunology Today**, Cambridge, v. 14, n. 7, p. 353-356, July 1993.

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

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

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

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

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

**CINÉTICA DE ANTICORPOS EM CABRAS E CONCEPTOS
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Neospora caninum*****ANTIBODY KINETICS IN GOATS AND CONCEPTUSES NATURALLY
INFECTED WITH *Neospora caninum*****Resumo**

O protozoário *N. caninum* é considerado um importante agente causador de abortos em bovinos, sendo que nesta espécie é responsável por eventos e alterações importantes na resposta imune humoral. Na neosporose caprina, informações a respeito da resposta imune humoral, bem como a ocorrência de problemas reprodutivos, são escassas. No presente estudo, avaliou-se a cinética de anticorpos em cabras gestantes, naturalmente infectadas por *N. caninum*, bem como de seus respectivos conceptos. Nas cabras gestantes, avaliou-se também o tipo de resposta imune baseado nas subclasses de IgG (IgG1 e IgG2). Os problemas reprodutivos relacionados à neosporose (aborto e natimorto) ocorreram em 15,38% dos caprinos. Houve uma associação estatisticamente

significativa entre o aumento nos títulos de IgG maternos na segunda metade gestacional com a ocorrência da transmissão transplacentária endógena, sendo que as cabras que tiveram esse aumento possuem 10 vezes mais chance de gerarem conceptos congenitamente infectados. A taxa de transmissão congênita foi de 77%. Durante a gestação das cabras soropositivas, houve principalmente o predomínio da subclasse IgG2 (Th1), embora padrões mistos IgG2-IgG1 e padrão IgG1 também tenham sido observados. Estes resultados indicam que o *N. caninum* é responsável pela ocorrência de alterações importantes na resposta imune de cabras naturalmente infectadas, bem como é um potencial agente causador de problemas reprodutivos em caprinos. A alta proporção de conceptos infectados sugere que a infecção congênita é uma das principais formas de transmissão do parasito em caprinos.

Palavras-Chave: anticorpos IgG1; anticorpos IgG2; caprinos; infecção transplacentária; neosporose

1. Introdução

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, e desde sua primeira descrição em cães em 1984 (Bjerkås et al., 1984), a neosporose é uma importante doença emergente em bovinos e cães, sendo considerada uma das principais causas de abortos em bovinos em várias regiões do mundo (Dubey et

al., 2007). Ocasionalmente, o *N. caninum* pode ser responsável pela ocorrência de abortos em outras espécies, tais como caprinos e ovinos (Dubey et al., 2006).

A importância epidemiológica, clínica e econômica da infecção por *N. caninum* em pequenos ruminantes ainda é incerta (Dubey and Schares, 2011). A soroprevalência em caprinos varia de 0,4% na Polônia (Czopowicz et al., 2011) a 19,7% no Brasil (Modolo et al., 2008). As cabras soropositivas para o parasito possuem 3,5 chances a mais de abortarem do que as cabras soronegativas (Varaschin et al., 2011).

Trees and Williams (2005) utilizam o termo infecção transplacentária (TPI) endógena, quando se referem à ocorrência da infecção *in utero* por um agente que havia estabelecido uma infecção crônica na parturiente, antes mesmo desta gestar, ao passo que a transmissão vertical se refere à infecção através de sucessivas gerações. Em bovinos, a TPI é uma das principais formas de infecção na neosporose, com estudos demonstrando altas taxas de bezerros congenitamente infectados (Paré et al., 1996; Schares et al., 1998; Davison et al., 1999), e que podem nascer saudáveis e transmitirem o parasito em uma próxima geração. Em ovinos experimentalmente infectados, foi demonstrado que o *N. caninum* pode ser transmitido através de sucessivas gerações (Silva, 2005).

Em vacas naturalmente infectadas têm sido observado um aumento nos títulos de anticorpos a partir da segunda metade gestacional (Paré et al., 1997;

Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001; Nogareda et al., 2007), sendo que este fato pode estar fortemente relacionado com a recrudescência do parasito com consequente TPI endógena. Este aumento nos valores de anticorpos específicos, em vacas naturalmente infectadas, estava relacionado principalmente com maiores valores da subclasse IgG2 (Guy et al., 2001; Andrianarivo et al., 2005; Staubli et al., 2006). Ao contrário, padrões predominantes da subclasse IgG1, bem como padrões mistos de IgG1-IgG2 também foram observados em vacas experimentalmente e naturalmente infectadas (Andrianarivo et al., 2001; Moore et al., 2005). Os diferentes mecanismos regulatórios da resposta imune que ocorrem durante a gestação de bovinos, aparentemente exercem um papel crucial na recrudescência do parasito, e consequentemente na TPI e patogênese do aborto (Innes et al., 2005). Em caprinos experimentalmente infectados, ocorreram aumentos nos títulos de IgG durante a gestação, com evidências da ocorrência de TPI (Lindsay et al., 1995). No entanto, até o presente momento, não há estudos a respeito da resposta humoral durante a gestação de cabras naturalmente infectadas pelo *N. caninum*, principalmente quando se refere às subclasses de IgG, as quais podem indicar o tipo de polarização da resposta imune. A fim de se estabelecer possíveis alterações na resposta imune humoral e relações da mesma com a ocorrência de TPI endógena e problemas reprodutivos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a cinética de IgG anti-*N. caninum*

em cabras e conceptos naturalmente infectados por *N. caninum*, bem como das subclasses IgG1 e IgG2 nas cabras gestantes.

2. Material e Métodos

2.1. Manejo dos caprinos

A realização do estudo se deu no Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil. Foram seguidas as considerações éticas estabelecidas por um comitê desta mesma instituição (Protocolo 013/2011). De 15 cabras pluríparas pertencentes às raças Saanen, Pardo-Alpina e mestiça, 13 cabras, naturalmente infectadas por *N. caninum*, foram utilizadas. As cabras foram identificadas como infectadas naturalmente por *N. caninum* baseadas na presença de anticorpos específicos contra o parasito, detectados antes da gestação e através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Duas cabras, que não apresentaram títulos de anticorpos anti-*N. caninum* por meio da RIFI, foram utilizadas como controles negativos. Todas as cabras foram mantidas em baias, de forma que não houvesse a possibilidade de exposição aos oocistos de *N. caninum*, ou outras fontes de infecção.

O estro foi sincronizado em todas as cabras, por meio da colocação de dispositivo intravaginal a base de progesterona (Progespon[®], Tecnopec) e

aplicação intramuscular de prostaglandina e gonadotrofina coriônica equina. No momento da detecção do estro realizou-se a monta natural.

2.2. Diagnóstico de gestação e coleta de amostras de sangue

A gestação foi diagnosticada através da ultrassonografia trans-retal no dia 30 após a monta. Mensalmente, a ultrassonografia foi realizada para monitorar a viabilidade fetal por meio dos batimentos cardíacos. No intuito de identificar quaisquer sinais de um possível aborto, os animais eram observados diariamente desde o dia do diagnóstico de gestação até o momento do parto. As amostras de sangue foram coletadas de cada cabra nos dias da monta (dia 0), dias 30, 60, 90, 120 e no dia do parto, ou do aborto; e nos três meses após o parto e/ou aborto (meses 1, 2 e 3). Dos cabritos que nasceram saudáveis, as amostras foram coletadas no dia do nascimento, sem que os mesmos tivessem mamado o colostro (dia 0), no dia 2 (48 horas após terem recebido o colostro), e nos dias 30, 60, 90, 120, 150 e 180. O sangue foi obtido através da veia jugular, por meio de tubos Vacutainer[®], sem anticoagulante e foi centrifugado a 1090g por 10 minutos. O soro obtido foi congelado e mantido a -20 °C até o momento da realização dos testes sorológicos. Amostras de sangue também foram coletadas dos fetos abortados e dos natimortos

2.3. *Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em cabras e cabritos*

O teste de imunofluorescência indireta foi utilizado para detectar anticorpos IgG anti-*N. caninum* semelhantemente à técnica descrita por Paré et al. (1995). Utilizou-se a diluição inicial de 1:50 como ponto de corte (Lindsay et al., 1995), e a partir desta foram realizadas diluições em série 2 (*twofold*). Taquizoítos do isolado NC-1 foram utilizados nas lâminas como antígenos. As amostras de soro foram diluídas em solução PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,2, 0,01M, e 20 microlitros (μL) de cada soro-teste foram colocados em cada compartimento da lâmina e foram incubados em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com solução PBS, e duas vezes com água destilada, totalizando quatro lavagens intervaladas a cinco minutos. As lâminas foram secadas à temperatura ambiente, e posteriormente incubadas a 37 °C, por 30 minutos, com anticorpo anti-IgG caprino conjugado à fluoresceína (Sigma-Aldrich) diluído a 1:200 em PBS. Realizaram-se novamente as lavagens, como descrito anteriormente, e as lâminas foram montadas em glicerina tamponada com tampão fosfato (pH 8,0; 0,5M). Consideraram-se positivas, as amostras em que havia completa fluorescência periférica dos taquizoítos semelhantemente ao descrito por Paré et al. (1995). Amostras que apresentaram fluorescências apicais ou parciais foram consideradas negativas.

2.4. Detecção das subclasses de IgG específicas contra *N. caninum* (IgG1 e IgG2) nas cabras soropositivas gestantes

As subclasses IgG1 e IgG2 anti-*N. caninum* foram avaliadas durante a gestação das 13 cabras, as quais eram sabidamente soropositivas na RIFI. As mesmas foram mensuradas por meio do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), utilizando um kit comercial (Chekit *Neospora caninum* Antibody ELISA, Idexx), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações descritas a seguir. Os anticorpos anti-IgG1 e IgG2 de bovinos conjugados a peroxidase (Bethyl) foram utilizados como os anticorpos de detecção nas diluições de 1:100 e 1:50 em PBS respectivamente (Marinero et al., 2009). Estudos preliminares estabeleceram que estes anticorpos utilizados (anti-IgG1 e IgG2 de bovinos) possuem reação cruzada com as subclasses de IgG de caprinos (Marinero et al., 2009). Controles positivos e negativos, previamente testados pela RIFI, foram utilizados. As placas foram lidas a A450 nm. Para a interpretação dos resultados, o Índice Relativo (IR) foi calculado tanto para os valores de IgG1 e IgG2. A equação que se segue foi utilizada para calcular o IR, a partir das médias das densidades ópticas (OD) obtidas por meio dos controles negativo (CN) e positivo (CP):

$$IR = \frac{OD_{amostra} - média OD_{CN}}{média OD_{CP} - média OD_{CN}} \times 100$$

Os valores de IgG1 e IgG2 em cada coleta das cabras gestantes foram obtidos, assim como a razão IgG2/IgG1 dos IR individuais em cada coleta durante a gestação.

2.5. Diagnóstico dos abortos e natimortos

Quatro fetos abortados e dois natimortos oriundos de duas cabras soropositivas, bem como as placentas das mesmas, foram submetidos à análise. Buscou-se avaliar as lesões compatíveis com a neosporose, tais como inflamação mononuclear associada a áreas de necrose, e presença de estruturas parasitárias. A presença do *N. caninum* foi estabelecida por meio da imunohistoquímica (IHQ), PCR e sequenciamento. Amostras de diversos tecidos coletadas durante a necropsia, bem como das placentas, foram fixadas em formalina tamponada a 10%, processadas pelos métodos rotineiros de histopatologia e emblocadas em parafina. Secções de 5 µm foram coradas pela hematoxilina e eosina e examinadas através de microscópio óptico. Para realização da IHQ, o anticorpo policlonal anti-*N. caninum* (VMRD, Pullman, USA) foi utilizado. Como diagnóstico diferencial utilizou-se o anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii* (VMRD, Pullman, USA). A PCR específica para a região ITS-1 (Payne and Ellis, 1996) e posterior sequenciamento (Sanger

et al., 1977), foram realizados utilizando amostras do lobo frontal cerebral, ápice cardíaco e placentas, coletados e armazenados a -20 °C.

2.6. *Análise estatística*

2.6.1. *Análise descritiva e univariada*

Foi feita a descrição da cinética dos anticorpos IgG total aferidos por meio da RIFI, e IgG1 e IgG2 avaliados por meio do ELISA em relação aos dias entre os diferentes fatores avaliados no estudo, como a ocorrência da TPI endógena e aumento nos títulos de anticorpos na segunda metade gestacional. Também foram descritas as diferenças encontradas entre as cabras no que tange ao predomínio de subclasses de IgG durante a gestação. Dos cabritos, foi calculada a taxa de transmissão vertical, considerando o número de cabras positivas que geraram cabritos positivos em relação àquelas que geraram cabritos negativos. A cinética de IgG total dos cabritos, definida por meio de RIFI, foi descrita em relação aos dias de vida.

Na análise estatística univariada, foi avaliada a associação entre o aumento de títulos de IgG anti-*N. caninum* das cabras na segunda metade gestacional em relação a primeira (0=não; 1=sim) e a ocorrência da TPI endógena aferida por meio de RIFI dos cabritos na pré-colostragem (0=não; 1=sim), pelo teste exato de Fischer, sendo a *Odds Ratio* (OR) calculada. Foi

avaliada também a associação, pelo teste exato de Fischer, entre os valores de IgG anti-*N. caninum* nas cabras no momento da cópula e parto (0=até 1:400; 1=mais que 1:400) com a ocorrência da TPI endógena (0=não; 1=sim). Correlações de Spearman foram testadas entre os títulos de IgG anti-*N. caninum* nos cabritos e dias de vida, assim como entre o título observado na pré-colostragem e aquele observado 48 horas (dia 2) após o fornecimento do colostro.

2.6.2. Modelos Lineares Generalizados (GLM) de medidas repetidas

Foram considerados os pressupostos necessários a utilização da análise de GLM, avaliados a partir dos testes de normalidade dos erros de Shapiro-Wilk, homocedasticidade de Levene e esfericidade de Mauchly sobre as variáveis endógenas incluídas no modelo em cada uma das coletas (Pestana and Gageiro, 2008). Nos casos em que não se observou esfericidade, foram utilizadas as correções do teste F de épsilon de Huynh-Feldt ou o critério de Greenhouse-Geiser. Estes testes foram aplicados nos diferentes modelos presentes no estudo: 1. IgG de cabras gestantes; 2. IgG dos cabritos; 3. IgG1; 4. IgG2; e 5. razão IgG2/IgG1. Apenas os modelos de IgG1 e IgG2 apresentaram normalidade dos erros, permitindo assim a aplicação do GLM.

Nas cabras que não sofreram o aborto, os efeitos dos dias de gestação (0, 30, 60, 90, 120 e parto) e TPI endógena, definida pela titulação de IgG anti-*N.*

caninum na pré-colostragem dos cabritos (positivo ou negativo), na titulação de anticorpos de IgG1 e IgG2, foi analisada pelo GLM de medidas repetidas da análise de variância. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do pacote estatístico PASW[®] 18.0, considerando um nível mínimo de significância de 95%.

3. Resultados

3.1. Diagnóstico de neosporose em abortos e natimortos

Das 15 gestações de cabras analisadas, sendo 13 soropositivas, somente em uma ocorreu o aborto, e em outra resultou em dois natimortos. As demais cabras pariram cabritos saudáveis. A ocorrência do aborto se deu aos 87 dias de gestação, enquanto que os natimortos foram expelidos aos 148 dias de gestação. A primeira cabra abortou quatro fetos, dos quais dois possuíam lesões histológicas características de *N. caninum*, sendo que apenas um deles apresentou titulação positiva na RIFI (1:400). Os natimortos também possuíam lesões compatíveis com neosporose e ambos foram positivos na RIFI (1:100). A presença do *N. caninum* nos tecidos de dois fetos abortados e dos dois natimortos foi confirmada por meio da IHQ e PCR, sendo que a IHQ para *T. gondii* foi negativa. As placentas oriundas das duas cabras também foram positivas na PCR. Nestes casos de aborto e natimorto considerou-se que houve

TPI endógena do parasito. Considerando as 13 cabras soropositivas, os problemas reprodutivos relacionados à neosporose (aborto e natimorto) ocorreram em 15,38% delas (2/13).

3.2. Análise de IgG anti-*N. caninum*, por meio de RIFI, nas cabras adultas

As duas cabras soronegativas na RIFI, utilizadas como controles, permaneceram negativas em todas as análises de IgG anti-*N. caninum* durante a gestação e nos três meses após o parto.

Dentre as 12 cabras que não abortaram, 10 (83,3%) apresentaram um aumento significativo nos valores de IgG anti-*N. caninum* a partir da segunda metade gestacional. Esse aumento foi determinado por meio da comparação entre as médias da concentração de anticorpos IgG anti-*N. caninum*, entre a primeira (dias 0, 30 e 60) e segunda (dias 90, 120 e parto) metade de gestação. As cabras que foram classificadas como tendo um aumento nos níveis de anticorpos tiveram a média da concentração na segunda metade gestacional 1,5 vezes maior do que na primeira. Uma vez que não há dados semelhantes para caprinos, este critério foi baseado em estudos em vacas, nos quais se obteve um aumento de 1,5 a 2,5 vezes (Stenlund et al., 1999) e 52% (López-Gatius et al., 2007) nos níveis de anticorpos a partir da segunda metade gestacional. Neste grupo das cabras que não abortaram, inclui-se uma que pariu dois natimortos,

esta possuía todas as coletas desde o dia 0 até o momento do parto. Não foi possível estabelecer um grupo de cabras que abortaram, uma vez que somente uma delas abortou. Esta cabra que abortou obteve picos no dia 30 e no dia do aborto (Tabela 1).

3.3. Análise de IgG1 e IgG2 anti-N. caninum na gestação das cabras soropositivas

No grupo de cabras que não abortaram, os dias de gestação, avaliados por meio do GLM de medidas repetidas da análise de variância, influenciaram os valores de IgG1 ($p=0,015$; $F=5,6$; $g.l.=2,07$). Entre o dia 120 e o parto houve uma queda significativa ($p<0,01$) nos valores de IgG1 nas cabras que transmitiram congenitamente, e um aumento significativo ($p<0,01$) nas cabras que não transmitiram congenitamente (Figura 1). O fator TPI não influenciou os valores de IgG1 ao longo da gestação.

Nas cabras que não abortaram, os dias de gestação e o fator TPI, avaliados no GLM de medidas repetidas da análise de variância, não tiveram efeito sobre os valores de IgG2 durante a gestação ($p>0,05$). No entanto, a TPI endógena, em relação aos valores de IgG2, demonstrou um nível de significância próximo do aceitável ($p=0,067$; $g.l.= 1$; $F= 4,7$), o que pode indicar

uma possível diferença nos valores de IgG2 durante a gestação causada pela ocorrência da transmissão congênita em cabritos (Figura 2).

As médias dos índices relativos das subclasses IgG1 e IgG2, durante a gestação das cabras que não abortaram estão representadas na Figura 3. Pode-se observar um predomínio dos valores de IgG2 em relação aos de IgG1 nas cabras durante a gestação, exceto no dia 0.

No que tange às razões IgG2/IgG1, oito cabras apresentaram razões maiores que 1 (padrão IgG2) durante a gestação (Tabela 2). Neste grupo incluem-se a cabra que sofreu o aborto (Cabra 7) e a cabra que deu origem aos natimortos (Cabra 9). Quatro animais apresentaram um padrão misto, e somente a cabra 5 apresentou valores de IgG2/IgG1 menores que 1 durante toda gestação (padrão de IgG1).

3.4. *Infecção transplacentária endógena e sua associação com os títulos de IgG anti-N. caninum maternos*

De 11 cabras soropositivas, as quais geraram cabritos saudáveis, oito pariram conceptos soropositivos para IgG anti-*N. caninum* na pré-colostragem (Tabela 3). Considerando que houve a TPI nos casos de aborto e natimorto, 10 das 13 cabras (77%) geraram cabritos congenitamente infectados.

Pelo teste exato de Fischer, houve associação entre o aumento de títulos de IgG anti-*N. caninum* das cabras que não abortaram na segunda metade gestacional, com a ocorrência da TPI endógena ($p=0,045$; $OR=10,0$; $IC95\% [1,558-64,198]$). Isto significa que as cabras que tiveram aumento de IgG na segunda metade gestacional possuem 10 vezes chances a mais de infectarem o feto através da placenta com o *N. caninum*. Nesta mesma análise, houve associação entre o título de IgG no dia da cópula das cabras e no parto (0=até 1:400; 1= mais que 1:400) com a ocorrência da TPI endógena ($p=0,045$, $OR=0,4$; $IC95\% [0,137-1,170]$; $p=0,018$, $OR=0,25$; $IC95\% [0,46-1,365]$). No entanto, não foi possível determinar o risco em função do intervalo de confiança da OR ter passado pelo número um.

3.5. Análise de IgG anti- *N. caninum*, por meio de RIFI, nos caprinos jovens

As Cabras 2, 3, 4, 5, e 10 conceberam dois cabritos cada. Ao passo que as Cabras 1, 6, 8, 11, 12 e 13 geraram somente um concepto. Os dois conceptos da Cabra 5 permaneceram soronegativos em todas as coletas realizadas. A Cabra 11 gerou um cabrito que, embora não tenha apresentado soropositividade no dia 0, apresentou no dia 2, após a colostragem (1:50). Seis conceptos apresentaram soropositividade em todas as coletas realizadas (Tabela 3). Ao passo que os Cabritos 4B, 6 e 8 tornaram-se soronegativos a partir do dia 120 e

permaneceram negativos até o dia 180. Apesar dos Cabritos 3A e 12 terem se tornado soronegativos nos dias 90 e 120 respectivamente, os mesmos voltaram a apresentar títulos de IgG anti-*N. caninum* no dia 180. Os Cabritos 10A e 10B nasceram soronegativos, no entanto adquiriram títulos de IgG anti-*N. caninum* 48 horas (dia 2) após terem recebido o colostro.

As duas cabras soronegativas geraram caprinos soronegativos na pré-colostragem e que também demonstraram valores negativos até os seis meses de idade avaliados.

Na correlação de Spearman, houve correlação negativa regular entre os dias de vida dos cabritos e os valores de IgG anti-*N. caninum* ($p= 0,001$; $r= -0,507$); e positiva forte entre os títulos de IgG anti-*N. caninum* pré e pós colostragem ($p= 0,06$; $r= 0,657$). Portanto, ao passar do tempo, há uma tendência à diminuição nos níveis séricos de IgG anti-*N. caninum* nos conceptos. E quanto maior for os níveis de anticorpos pré-colostrais, maiores tendem a ser os níveis detectados, 48 horas após a colostragem.

4. Discussão

O presente estudo, em cabras e conceptos naturalmente infectados por *N. caninum*, foi desenvolvido no intuito de verificar possíveis alterações nos anticorpos anti-*N. caninum* (IgG, IgG1 e IgG2) durante a gestação das cabras,

bem como a relação dos mesmos com a ocorrência da infecção transplacentária e de problemas reprodutivos. Os picos nos valores de IgG, obtidos na segunda metade gestacional, nas cabras soropositivas, variaram de 1:800 a 1:25600 (Tabela 1). Títulos semelhantes foram observados em cabras experimentalmente infectadas durante a gestação, sendo que os mesmos variaram de 1:6400 a 1:25600 após 4 a 5 semanas de inoculação (Lindsay et al., 1995). Na segunda gestação destas cabras experimentalmente infectadas, sem que houvesse a inoculação, os títulos, nas coletas realizadas, variaram entre 1:400 e 1:3200 (Lindsay et al., 1995). O aumento significativo nos títulos de IgG anti-*N. caninum* na segunda metade gestacional, em relação a primeira, foi detectado em 83,3% das cabras que não sofreram o aborto, incluindo a cabra que deu origem aos natimortos. Semelhantemente, esse aumento nos níveis de anticorpos a partir da segunda metade gestacional também é relatado em bovinos naturalmente infectados (Paré et al., 1997; Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001; Nogareda et al., 2007). Considerando que, nas condições deste experimento, era improvável que ocorresse o contato das cabras com fontes externas de infecção, muito provavelmente, o aumento nos níveis de IgG anti- *N. caninum* nas cabras gestantes refletiram a ocorrência da recrudescência do parasito. Fato este, que também tem sido observado durante a gestação de vacas cronicamente

infectadas (Paré et al., 1997; Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001; Nogareda et al., 2007).

Em caprinos ainda há poucas informações sobre a transmissão congênita. Ao passo que em vacas, a infecção pelo *N. caninum* pode persistir e levar a TPI endógena, inclusive com nascimento de conceptos saudáveis, potencialmente transmissores em uma próxima geração (Dijkstra et al., 2008). Em ovinos experimentalmente infectados, a infecção pelo *N. caninum* persistiu e foi transmitida através de sucessivas gerações, inclusive com o nascimento de conceptos saudáveis (Silva, 2005). A soropositividade dos cabritos na pré-colostragem e a presença do parasito nos fetos abortados e natimortos, indicam uma clara associação entre a soropositividade nas cabras e a ocorrência da TPI endógena. Nos ruminantes, a placenta sindesmocorial não permite a passagem de anticorpos da mãe para o feto (Chucrí et al., 2010), portanto os anticorpos anti-*N. caninum* detectados na pré-colostragem dos conceptos foram produzidos a partir de uma infecção que ocorreu durante a gestação, refletindo a ocorrência da TPI. No presente estudo, houve associação entre o aumento nos níveis de IgG na segunda metade gestacional e a ocorrência da TPI endógena nos cabritos. As cabras que tiveram esse aumento nos títulos de IgG, apresentaram 10 vezes mais chances de gerarem conceptos infectados. Em bovinos, aumentos bem definidos nos anticorpos anti-*N. caninum* maternos se correlacionaram positivamente com

infecção congênita (Paré et al., 1997; Guy et al., 2001). Portanto, em caprinos, o aumento nos títulos de anticorpos na segunda metade gestacional, sugere fortemente a ocorrência da TPI endógena.

A taxa de TPI verificada por meio dos títulos nos cabritos na pré-colostragem, e considerando também a ocorrência deste tipo de transmissão nos casos de aborto e natimortos, foi de 77%. Taxas de infecção congênita semelhantes, tais como 75% (Hall et al., 2005), 81% (Paré et al., 1996) e 69,2% (Hein et al., 2012) têm sido observadas em bovinos. Taxas menores e maiores também têm sido relatadas em bovinos: 24% (Oliveira et al., 2010); 94% (Schaes et al., 1998); e 95% (Davison et al., 1999). Em caprinos uma taxa média de 31,8% de transmissão vertical foi observada em caprinos através de sucessivas gerações (Altbuch et al., 2012). Estas diferenças nas taxas de transmissão provavelmente podem ser decorrentes de um aumento na imunidade frente à infecção transplacentária, uma vez que a proporção de bezerros congenitamente infectados diminuiu com sucessivas gestações (Dijkstra et al., 2003). Entretanto, a infecção congênita é geralmente aceita como o meio principal de transmissão e manutenção do *N. caninum* em rebanhos bovinos (Hietala and Thurmond 1999). Este meio de infecção possivelmente também é importante para a transmissão e manutenção do *N. caninum* em caprinos, uma

vez que a taxa de transmissão congênita observada nas cabras do presente estudo foi relativamente alta (77%).

Houve associação entre os títulos das cabras no momento da cópula e parto (até 1:400 e maior que 1:400) e a ocorrência da TPI endógena. Embora a Cabra 10, tenha gerado cabritos soronegativos (Cabritos 10A e 10B) na pré-colostragem, a mesma apresentou um aumento ao final da gestação (1:400) e no primeiro mês (1:800) após o parto (Tabela 1). Muito provavelmente, esse aumento nos níveis de anticorpos ao final da gestação pode indicar a recrudesência do parasito. Entretanto a infecção tardia nos fetos pode ter resultado em um estímulo insuficiente para a detecção de anticorpos ao nascimento (Paré et al., 1996), ou os anticorpos poderiam estar sendo produzidos, porém ainda não puderam ser detectados no momento do nascimento. Os cabritos 10A e 10B apresentaram títulos de IgG ($\geq 1:200$) 48 horas após a colostragem (Tabela 3), o que condiz com os altos valores de IgG1 apresentados pela Cabra 10 no momento do parto (IR 222,57%), uma vez que a subclasse IgG1 perfaz 95 a 98% da IgG total no colostro de caprinos (Mícusan and Borduas, 1977). A TPI também não foi observada nas Cabras 5 e 11. No entanto, diferentemente da Cabra 10, aquelas mantiveram títulos mais baixos durante toda a gestação ($\leq 1:200$), sendo que não apresentaram alterações significativas nos títulos de IgG. Semelhantemente, vacas que tiveram bezerros

soronegativos para *N. caninum*, não demonstraram diferenças significativas na resposta humoral (Guy et al., 2001). A Cabra 5, apresentou uma queda gradativa nos títulos durante a gestação, e apresentou valores negativos no Mês 1, 2 e 3 após o parto (Tabela 1). Semelhantemente, a Cabra 11 apresentou-se soronegativa no Mês 3 após o parto. Em bovinos, considerando títulos de 1:200, a soroconversão em vacas soropositivas estava associada a uma baixa taxa de transmissão transplacentária (Kyaw et al., 2005). Os eventos e alterações da resposta imune humoral ocorrida nas cabras pluríparas do presente estudo, principalmente naqueles observados nas Cabras 5 e 11, podem ajudar a estabelecer pontos de corte mais precisos para a RIFI. Porém, é difícil estabelecer pontos de corte na RIFI iguais para diferentes laboratórios, pois os mesmos são muito dependentes da qualidade do equipamento utilizado na microscopia de fluorescência (Dubey and Schares, 2006). No presente estudo, foi utilizado o ponto de corte de 1:50 (Paré et al., 1995; Varaschin et al., 2011), no entanto, alguns pesquisadores utilizam pontos de corte maiores para caprinos, como de 1:100 (Uzêda et al., 2007), e para bovinos geralmente se utilizam títulos maiores, de 1:160 a 1:640 (Björkman and Ugglå, 1999). Entretanto, alguns pesquisadores utilizam títulos na RIFI de 1:25, quando se trata de sorologia de bezerros (Wouda et al., 1997).

Os anticorpos específicos contra *N. caninum* persistiram em 8 de 11 cabritos congenitamente infectados até os seis meses de idade (Tabela 3). Por meio da Correlação de Spearman, houve correlação negativa entre os dias e os títulos de IgG, ou seja, com o passar dos dias de vida há uma tendência à diminuição dos anticorpos. Semelhantemente ao que ocorreu em cabritos que nasceram numa segunda gestação de cabras, experimentalmente infectadas na primeira gestação, sendo que estes apresentaram títulos entre 1:200 e 1:1600 no primeiro dia de vida, e decresceram para 1:100 e 1:800 aos 28 dias de idade (Lindsay et al., 1995). Apenas 4% dos bezerros congenitamente infectados apresentaram-se soronegativos para *N. caninum* no período dos nove aos 18 meses de idade, entretanto, os mesmos apresentaram-se soropositivos novamente aos 25 meses de idade (Hietala and Thurmond, 1999). O mesmo ocorreu com os Cabritos 3A e 12, os quais se apresentaram soronegativos nos dias 90 e 120 respectivamente, e voltaram a apresentar títulos aos seis meses de idade. Embora três cabritos tenham apresentado valores soronegativos até os seis meses de idade, os mesmos podem voltar a apresentar títulos em idades subsequentes, fato este atribuído a não detecção do parasito pelo sistema imunológico (Hietala and Thurmond, 1999).

Na gestação, embora pareça existir um balanço, entre as respostas Th1/Th2 (Wilczyński, 2005), as citocinas do tipo Th2 regulam negativamente

àquelas oriundas do tipo Th1, assim na gestação normal prevalece a resposta do tipo Th2 (Raghupathy, 1997; Druckmann and Druckmann, 2005). As células trofoblásticas produzem IL-10, criando um ambiente com citocinas do tipo Th2 na interface materno-fetal, o que é favorável à manutenção da gestação (Wegmann et al., 1993), no entanto desfavorável ao controle de infecções por patógenos intracelulares (Szabo et al., 2003; Mowen and Glimcher, 2004). Na neosporose, bovinos cronicamente infectados, a modulação da resposta imune, principalmente a regulação na produção de IFN- γ (Th1), que geralmente ocorre por volta da metade gestacional, faz com que o animal não esteja apto a lidar com a infecção, ocorrendo, portanto, a recrudescência, parasitemia e infecção do feto (Innes et al., 2001). Em murinos, as células Th1 produzem IFN- γ , IL-2 e TNF- β (linfotoxina B), as quais são responsáveis por promoverem uma resposta imune contra patógenos intracelulares (resposta Th1), e mudança de subclasse para IgG2, ao passo que as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, as quais são fundamentais para a produção de anticorpos (resposta Th2) e mudança de subclasse para IgG1 (Szabo et al., 2003; Mowen and Glimcher, 2004). Semelhantemente, em bovinos, a resposta imune do tipo Th1, associada à secreção de IFN- γ , induz a produção da subclasse IgG2 (Estes et al., 1994), ao passo que as células Th2, as quais secretam IL-4, induzem a produção de IgG1 (Estes et al., 1995). Uma vez que a resposta imune de caprinos é semelhante

àquela observada em bovinos (Butler, 1983, 1998), indiretamente a resposta por um determinado tipo de subclasse de IgG em caprinos, pode indicar a natureza da regulação pelas células T auxiliares. Embora a regulação da resposta Th1 na gestação pareça existir (Innes et al., 2001), oito cabras (Tabela 2), apresentaram um predomínio de IgG2 durante a gestação, o que muito provavelmente reflete uma tendência ao predomínio da resposta Th1 com a provável produção de IFN- γ , nestes caprinos. Citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , as quais são importantes para a efetividade da resposta Th1 e conseqüentemente para a erradicação de patógenos intracelulares, como no caso do *N. caninum*, são potencialmente danosas, podendo culminar no aborto (Raghupathy, 1997). A produção de IFN- γ , numa conversão da resposta Th2 em Th1 na gestação, tem sido associada à ocorrência de abortos na neosporose bovina (Quinn et al., 2002; Innes et al., 2005). Entretanto, alguns estudos em bovinos naturalmente infectados, demonstram que a resposta Th1, mediada pela produção de IFN- γ , está associada com a proteção contra o aborto (López-Gatius et al., 2007; Almería et al., 2009). Somente em duas cabras (Cabra 7 e 9), das oito que apresentaram um predomínio de IgG2 durante a gestação, tiveram perdas relacionadas a neosporose. Este fato poderia ser explicado pela falta de produção de IFN- γ , uma vez que em alguns bovinos que abortaram, apesar de terem apresentados altos níveis de IgG2, não foram detectados níveis de IFN- γ , sendo

que altos níveis de IgG2 associados ao IFN- γ , foram protetores contra o aborto (Almería et al., 2009). Das oito cabras que tiveram um predomínio de IgG2, somente em uma não ocorreu a TPI. Embora a resposta Th1, mediada por IFN- γ , possa ser protetora contra a ocorrência do aborto, a mesma não evita a transmissão transplacentária (López-Gatius et al., 2004). A TPI, em relação aos valores de IgG2 nas cabras que não abortaram, demonstrou um nível de significância próximo do aceitável ($p=0,067$; g.l.= 1; $F= 4,7$), podendo indicar uma possível diferença entre os valores de IgG2 nas cabras que transmitiram congenitamente ou não, sendo que os maiores valores de IgG2 foram observados naquelas em que houve a transmissão transplacentária (Fig. 4). Semelhantemente, bovinos naturalmente infectados e que geraram bezerros congenitamente infectados desenvolveram altos títulos de IgG2 (Guy et al., 2001), sendo que a reativação da infecção latente em novilhas naturalmente infectadas estava associada principalmente ao aumento nos valores de IgG2 (Andrianarivo et al., 2005). Apesar da Cabra 5 ter apresentado um predomínio de IgG1, este caprino manteve baixos títulos de IgG durante a gestação, fato provavelmente relacionado com a ausência da transmissão congênita observada nesta cabra. Três, dentre quatro cabras que tiveram um padrão misto de IgG2/IgG1 durante a gestação, geraram cabritos congenitamente infectados. A Cabra 10, apesar de ter apresentado um padrão misto, não gerou cabritos

congenitamente infectados. Fato este que poderia ser explicado por uma recrudescência tardia da infecção, uma vez que houve um aumento ao final da gestação nos títulos de anticorpos, principalmente IgG1. Em relação aos valores de IgG1 durante a gestação de cabras que não abortaram, houve influência dos dias nos valores dos títulos de IgG1. No grupo de cabras que transmitiram congenitamente, houve uma queda significativa nos valores de IgG1 observados no dia do parto (Figura 3). Diferentemente, no grupo de cabras que não transmitiram congenitamente, houve um pico no dia do parto, fato este que poderia ser explicado pelo valor discrepante apresentado pela Cabra 10 (IR 222,57%), e que provavelmente esteja relacionado com uma recrudescência mais tardia do parasito.

Os resultados e as observações do presente estudo indicam que nas cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, a infecção transplacentária endógena do feto estava associada a um aumento nos títulos de IgG maternos durante a segunda metade gestacional. Os caprinos que apresentaram este aumento, possuem 10 vezes a mais de chances de gerarem conceptos congenitamente infectados. Durante a gestação das cabras soropositivas, observou-se principalmente o predomínio de anticorpos IgG2 (resposta Th1), embora padrões mistos e um padrão IgG1 também tenham sido observados. A taxa de transmissão (77%) relativamente alta sugere a importância da TPI na

neosporose em caprinos, tornando os conceptos saudáveis potencialmente transmissores do parasito para gerações futuras. A ocorrência de problemas reprodutivos relacionados a neosporose em 15,38% das cabras soropositivas, sugere-se que o *N. caninum* é um potencial agente causador de abortos e natimortos em caprinos.

Agradecimentos

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

5. Referências

Almería, S., Nogareda, C., Santolaria, P., Garcia-Ispuerto, I., Yániz, J.L., López-Gatius, F., 2009. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130, 35-42.

Altbuch, J.A., Schofield, M.J., Porter, C.A., Gavin, W.G., 2012. *Neospora caninum*: a successful testing and eradication program in a dairy goat herd. Small Rum. Res. 105, 341-344.

Andrianarivo, A.G., Barr, B.C., Anderson, M.L., Rowe, J.D., Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. Parasitol. Res. 87, 817-825.

Andrianarivo, A.G., Anderson, M.L., Rowe, J.D., Gardner, I.A., Reynolds, J.P., Choromanski, L., Conrad, P.A., 2005. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. Parasitol. Res. 96, 24-31.

Bjerkås, I., Mohn, S.F., Presthus, J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd. 70, 271-274.

Björkman, C., Uggla, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int. J. Parasitol. 29, 1497-1507.

Butler, J.E., 1983. Bovine immunoglobulins: an argued review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 4, 43-152.

Butler, J.E., 1998. Immunoglobulin diversity, B-cells and antibody repertoire development in large farm animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17, 43-70.

Chucrí, T.M., Monteiro, J.M., Lima, A.R., Salvadori, M.L.B., Junior Kfoury, J.R., Miglino, M.A., 2010. A review of immune transfer by placenta. *J. Reprod. Immunol.* 87, 14-20.

Czopowicz, M., Kaba, J., Szaluś-Jordanow, O., Nowicki, M., Witkowski, L., Frymus, T., 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. *Vet. Parasitol.* 178, 339-341.

Davison, H.C., Otter, A., Tress, A.J., 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.* 29, 1683-1689.

Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Beiboer, M.L., Wouda, W., 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.* 110, 161-169.

Dijkstra, T., Lam, T.J.G.M., Bartels, C.J.M., Eysker, M., Wouda, W., 2008. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. *Vet. Parasitol.* 152, 220-225.

Druckmann, R., Druckmann, M.A., 2005. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 97, 389-396.

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

Dubey, J.P., Schares, G., 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140, 1-34.

Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W., 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Path.* 134, 267-289.

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

Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals-The last five years. *Vet. Parasitol.* 180, 90-108.

Estes, D.M., Closser, N.M., Allen, G.K., 1994. IFN- γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cell. Immunol.* 154, 287-295.

Estes, D.M., Hirano, A., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A.E., Brown, W.C., 1995. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in vitro*. *Cell. Immunol.* 163, 268-279.

Guy, C.S., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., MacGarry, J.W., Guy, F., Björkman, C., Smith, R.F., Tress, A.J., 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.* 149, 443-449.

Hall, C.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2005. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol.* 128, 231-241.

Hein, H.E., Machado, G., Miranda, I.C.S., Costa, E.F., Pellegrini, D.C.P., Driemeier, D., Coberllini, L.G., 2012. Neosporose bovina: avaliação da transmissão vertical e fração atribuível de aborto em uma população de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 396-400.

Hietala, S.K., Thurmond, M.C., 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int. J. Parasitol.* 29, 1669-1676.

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

Innes, E.A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macadolwie, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., 2005. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 29-36.

Kyaw, T., Suwimonteerabutr, Virakul, P., Lohachit, C., Kalpravidh, W., 2005. Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. *Vet. Parasitol.* 131, 145-150.

Lindsay, D.S., Rippey, N.S., Powe, T.A., Sartin, E.A., Dubey, J.P., Blackburn, B.L., 1995. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pigmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1176-1180.

López-Gatius, F., Pabón, M., Almería, S., 2004. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 62, 606-613.

López-Gatius, F., Almería, S., Donofrio, G., Nogareda, C., García-Ispuerto, I., Bech-Sàbat, G., Santolaria, P., Yániz, J.L., Pabón, M., Souza, N.M., Beckers, J.F., 2007. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology* 68, 1067-1073.

Marinaro, M., Bellacicco, A.L., Camero, M., Tarsitano, E., Tempesta, M., Cassone, A., Buonavoglia, C., 2009. Caprine herpesvirus-1-specific IgG subclasses in naturally and experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 138, 266-272.

Micusan, V.V., Borduas, A.G., 1977. Biological properties of goat immunoglobulins G. *Immunology* 32, 373-381.

Modolo, J.R., Stachissini, A.V.M., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Langoni, H., Padovani, C.R., Barrozo, L.V., Leite, B.L.S., 2008. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. *Pesq. Vet. Bras.* 28, 597-600.

Moore, D.P., Leunda, M.R., Zamorano, P.I., Odeón A.C., Romera, S.A., Cano, A., de Yaniz, G., Venturini, M.C., Campero, C.M., 2005. Immune response to

Neospora caninum in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet. Parasitol.* 130, 29-39.

Mowen, K.A., Glimcher, L.H., 2004. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol. Rev.* 202, 203-222.

Nogareda, C., López-Gatius, F., Santolaria, P., García-Ispuerto, I., Bech-Sàbat, G., Pabón, M., Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Yániz, J., Almeria, S., 2007. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Vet. Parasitol.* 148, 193-199.

Oliveira, V.S.F., Alvarez-Garcia, G., Ortega-Mora, L.M., Borges, L.M.F., Silva, A.C., 2010. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in a embryo transfer center. *Vet. Parasitol.* 173, 206-210.

Paré, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C., 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 273-275.

Paré J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhooood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60, 133-139.

Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83, 82-87.

Payne, S., Ellis, J., 1996. Detection of *Neospora caninum* DNA by polymerase chain reaction. *Int. J. Parasitol.* 26, 347-351.

Pestana, M.H., Gageiro, J.N., 2008. *Análise de dados para ciências sociais: a complementariedade do spss*. Sílabo, Lisboa, 694pp.

Quinn, H.E., Ellis, J.T., Smith, N.C., 2002. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy. *Trends Parasitol.* 18, 391-394.

Raghupathy, R., 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today* 18, 478-482.

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

Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Bärwald, A., Conraths, F.J., 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet. Parasitol.* 80, 87-98.

Silva, C.H.S., 2005. Estudo da transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas deslanadas. 54p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

Staubli, D., Sager, H., Haerdi, C., Haessig, M., Gottstein, B., 2006. Precolostral serology in calves born from *Neospora*-seropositive mothers. *Parasitol. Res.* 99, 398-404.

Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Ugglå, A., Björkman, C., 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 85, 227-234.

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., Glimcher, L.H., 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 713-758.

Trees, A.J., Williams, D.J.L., 2005. Endogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol. 21, 558-561.

Uzêda, R.S., Pinheiro, A.M., Fernández, S.Y., Ayres, M.C.C., Gondim, L.F.P., Almeida, M.A.O., 2007. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. Small Rum. Res. 70, 257-259.

Varaschin, M.S., Guimarães, A.M., Hirsch, C., Mesquita, L.P., Abreu, C.C., Rocha, C.M.B.M., Wouters, F., Moreira, M.C., 2011. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. Pesq. Vet. Bras. 31, 53-58.

Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R., 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T_h2 phenomenon? Immunol. Today 14, 353-356.

Wilczyński, J.R., 2005. Th1/Th2 cytokines balance-*yin* and *yang* of reproductive immunology. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 122, 136-143.

Wouda, W., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., 1997. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. J. Parasitol. 83, 545-547.

Tabela 1 – Títulos de IgG-anti *N. caninum* em cabras gestantes, avaliados por meio de RIFI, desde o Dia 0 até o Mês 3 após parto/aborto.

Cabra	Gestação					Parto	Pós parto/aborto		
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120		Mês 1	Mês 2	Mês 3
1	400	400	400	400	800	800	800	800	800
2	400	400	400	1600	3200	1600	400	200	200
3	400	400	400	400	800	1600	200	100	50
4	3200	3200	3200	6400	6400	3200	800	800	400
5 ^a	200	100	100	50	50	50	0	0	0
6	6400	6400	6400	25600	3200	3200	800	800	800
7 ^b	800	3200	1600	6400			1600	400	400
8	400	400	400	400	3200	1600	3200	1600	400
9 ^c	100	400	200	200	800	3200	800	400	400
10 ^a	100	100	100	100	100	400	800	400	200
11 ^a	50	100	100	100	50	200	50	50	0
12	400	400	800	800	800	1600	800	800	400
13	400	400	800	1600	800	1600	3200	3200	3200

^aCabras que geraram cabritos soronegativos na pré-colostragem; ^bcabra que abortou (dia 90 aproximado), nesta os valores no dia 90 e no parto são inexistentes; ^ccabra que deu origem aos natimortos;

Tabela 2 – Razões dos valores de IgG2/IgG1 avaliados por meio de ELISA, durante a gestação das 13 cabras soropositivas naturalmente infectadas por *N. caninum*.

Cabra	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Parto	Padrão predominante de IgG
1	0,34	1,88	1,38	1,87	1,70	1,65	IgG2
2	0,20	0,68	0,78	5,11	1,18	1,77	Misto
3	1,79	3,16	2,16	^c	0,73	5,23	Misto
4	1,27	6,25	1,82	1,63	1,34	1,39	IgG2
5	0,05	0,22	0,07	2,01	0,04	0,40	IgG1
6	1,66	1,24	1,12	1,95	1,71	0,97	IgG2
7 ^a	2,80	1,48	1,72	1,08			IgG2
8	0,86	1,82	^c	0,57	0,88	0,82	Misto
9 ^b	1,75	2,25	1,62	1,03	1,35	2,06	IgG2
10	0,47	1,60	n/d	1,42	5,09	0,08	Misto
11	1,64	1,11	2,46	2,49	4,00	4,20	IgG2
12	2,41	1,08	0,63	1,77	2,12	2,49	IgG2
13	1,33	1,55	1,23	1,04	1,05	1,19	IgG2

^a Cabra que sofreu o aborto, nesta os valores no dia 90 e no parto são inexistentes; ^b Cabra que deu origem aos natimortos; ^c Dados não avaliados; n/d – não detectados níveis de IgG1

Tabela 3 – Títulos de IgG anti-*N. caninum* nos conceptos, avaliados por meio de RIFI, desde o nascimento até os 6 meses de idade.

Cabra	Cabrito	Títulos de IgG anti- <i>N. caninum</i>							
		Dia 0	Dia 2	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
1	1	400	3200	1600	800	50	50	50	100
2	2A	400	1600	400	50	50	50	50	100
	2B	800	1600	800	200	200	100	200	200
3	3A	1600	400	400	50	0	0	0	100
	3B	200	1600	400	200	50	50	200	200
4	4A	1600	1600	1600	400	100	50	50	50
	4B	1600	1600	800	100	50	0	0	0
6	6	400	3200	400	200	50	0	0	0
8	8	1600	1600	1600	400	100	0	0	0
10	10A	0	200	800	800	n/c	n/c	n/c	n/c
	10B	0	400	400	100	n/c	n/c	n/c	n/c
12	12	800	1600	400	50	50	0	0	50
13	13	3200	6400	400	200	200	50	200	400

n/c – não coletado

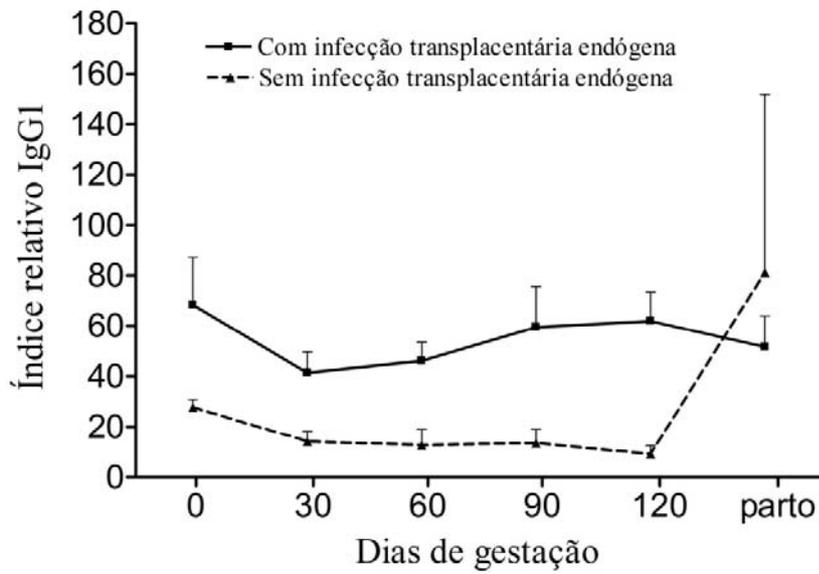


Figura 1. Médias (unidades \pm S.E.M.) dos valores de IgG1 anti-*N. caninum* avaliados por meio de ELISA, desde o dia 0 até o parto nas cabras que não abortaram, que transmitiram o parasito para a progênie (n=9) ou não (n=3).

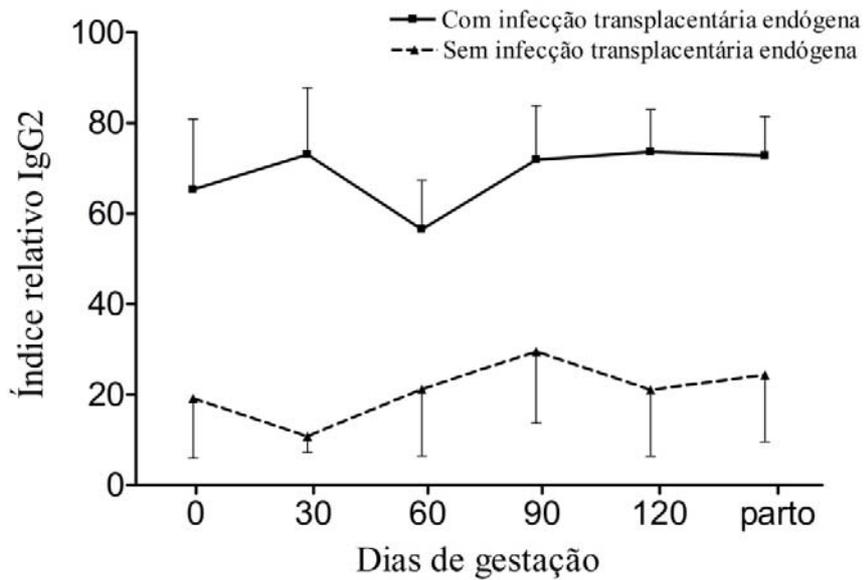


Figura 2. Médias (unidades \pm S.E.M.) dos valores de IgG2 anti-*N. caninum* avaliados por meio de ELISA, desde o dia 0 até o parto nas cabras que transmitiram o parasito para a progênie (n=9) ou não (n=3).

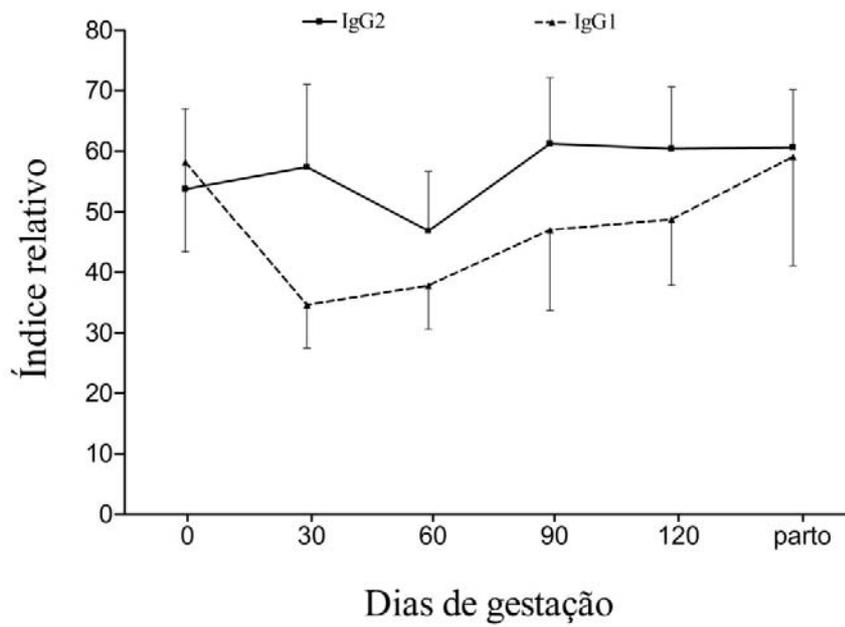


Figura 3. Médias (unidades \pm S.E.M.) dos valores de IgG1 e IgG2 anti-*N. caninum* das cabras que não abortaram, avaliados por meio de ELISA, desde o dia 0 até o parto.

ARTIGO 2

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

***Neospora caninum* EM ABORTOS, NATIMORTOS E PLACENTAS DE
CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS NO BRASIL**

***Neospora caninum* in abortions, stillbirths and placenta of naturally
infected goats in Brazil**

Resumo

N. caninum é considerado um dos mais importantes agentes causadores de abortos em bovinos. Entretanto, em caprinos, a real importância da infecção pelo parasito ainda permanece desconhecida. O objetivo deste estudo foi descrever casos de abortos e natimortos em cabras naturalmente infectadas pelo *N. caninum*, bem como relacionar os aspectos patológicos, imuno-histoquímicos e moleculares em placentas, nos fetos abortados e natimortos. Dois fetos e dois natimortos oriundos de duas cabras respectivamente, dentre 13 cabras naturalmente infectadas provenientes de um estudo sobre este parasito em caprinos, apresentaram lesões sugestivas de infecção por protozoários. As lesões no sistema nervoso central, caracterizadas principalmente por encefalite não

supurativa multifocal associada ou não a áreas de necrose, e gliose, foram semelhantes entre os dois fetos e natimortos, porém distinguiram-se pela localização. Somente os dois fetos abortados apresentaram lesões no coração e músculo estriado esquelético, sendo que as mesmas consistiam de infiltrado inflamatório mononuclear de graus variados. Somente em um dos fetos abortados foram observados raros cistos protozoários no sistema nervoso central, e taquizoítos, evidenciados pela imuno-histoquímica, em amostras de coração e musculatura estriada esquelética. Nos natimortos os numerosos cistos foram visualizados somente no sistema nervoso central. Nos fetos abortados e nos natimortos a presença do *N. caninum* foi determinada pela análise imuno-histoquímica, PCR e sequenciamento. As placentas oriundas dos abortos e natimortos apresentaram lesões acentuadas caracterizadas principalmente por necrose, envolvendo o mesênquima dos vilos cório-alantóicos e as células trofoblásticas, além de inflamação mononuclear, por vezes associada a infiltrado neutrofílico. O DNA do *N. caninum* foi detectado nestas placentas, no entanto nas mesmas não foram visualizadas marcações na imuno-histoquímica. Das onze placentas de cabras naturalmente infectadas e que pariram conceptos saudáveis, cinco apresentaram lesões histopatológicas caracterizadas por infiltrados inflamatórios mononucleares, sendo que em sete o DNA de *N. caninum* foi detectado. Destas sete, em apenas uma, detectou-se a presença do *N. caninum*

por meio de imuno-histoquímica. Este estudo demonstra que o *N. caninum* pode exercer um papel importante como agente causador de abortos e natimortos em caprinos naturalmente infectados, com lesões severas nos fetos, natimortos e placenta. Adicionalmente, os resultados aqui apresentados ressaltam a importância da utilização de mais de uma ferramenta diagnóstica, como a PCR e imuno-histoquímica, para detecção do parasito, uma vez que este nem sempre é visualizado nos testes histopatológicos, principalmente em placentas. Além disso, *N. caninum* deve ser considerado dentro do diagnóstico diferencial de distúrbios reprodutivos em caprinos.

Palavras-chave: caprinos, imuno-histoquímica, infecção transplacentária, neosporose, PCR

1. Introdução

N. caninum é um protozoário intracelular obrigatório, com características estruturais e ciclo de vida semelhantes aos de *Toxoplasma gondii* (Dubey and Lindsay, 1996). Mundialmente, este parasito é reconhecido como uma das principais causas de aborto em bovinos (Dubey et al., 2007), sendo que a encefalite não supurativa, associada a necrose, é a lesão mais característica da doença (Barr et al., 1991). Além do aborto, outras manifestações clínicas também são descritas tais como morte fetal, seguida por mumificação ou

autólise, natimortos, conceptos que nasceram vivos com sinais clínicos, ou que nasceram clinicamente normais porém persistentemente infectados (Dubey and Schares, 2011).

O aborto por protozoários em cabras é classicamente associado ao *Toxoplasma gondii*, no qual lesões necróticas características são observadas no sistema nervoso central (Buxton, 1998). Embora a neosporose seja semelhante à infecção por *T. gondii*, a real importância do *N. caninum* como agente causador de problemas reprodutivos em caprinos ainda é desconhecida (Dubey, 2003; Dubey and Schares, 2011). Estudos têm demonstrado diferentes soroprevalências para o parasito em caprinos, sendo que as mesmas variaram de 0,4% na Polônia (Czopowicz et al., 2011) a 19,7% no Brasil (Modolo et al., 2008). Em cabras, abortos e natimortos, atribuídos ao *N. caninum* têm sido pouco relatados (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1992; Dubey et al., 1996; Eleni et al., 2004; Moreno et al., 2012). No Brasil, até o presente momento, não há descrições de abortos e natimortos relacionados ao *N. caninum*, sendo descritos apenas casos em que o conceito nasceu com sinais neurológicos relacionados à doença (Coberllini et al., 2001; Varaschin et al., 2012).

O objetivo do presente estudo é descrever casos de abortos e natimortos associados ao *N. caninum* em cabras naturalmente infectadas provenientes de rebanhos distintos, localizados no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil,

bem como avaliar os aspectos patológicos e as diferenças encontradas entre as diferentes técnicas diagnósticas mais comumente utilizadas para a detecção do parasito em placentas, fetos abortados e natimortos.

2. Material e Métodos

2.1. Origem da amostragem e coleta de material

As amostras são provenientes de um rebanho caprino composto por 15 animais, dos quais 13 são naturalmente infectados por *N. caninum* e dois soronegativos foram utilizados como controles. Deste rebanho, 11 cabras soropositivas e duas soronegativas geraram conceptos saudáveis. Entretanto, uma cabra abortou quatro fetos aos 87 dias de gestação (Cabra 1), ao passo que outro caprino (Cabra 2) gerou dois natimortos, expelidos aos 148 dias de gestação. Estes dois animais eram sabidamente soropositivos (>1:50) por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A Cabra 1 possuía histórico anterior de repetição de cio, e a Cabra 2 já havia abortado anteriormente. Todos os caprinos eram provenientes de rebanhos distintos localizados no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil, e oriundos de um estudo de soroprevalência (Varaschin et al., 2011). Os rebanhos, dos quais a Cabra 1 e 2 eram pertencentes, possuíam histórico de aborto e nascimento de conceptos fracos. Os quatro fetos e os natimortos foram submetidos a uma necropsia, avaliando-se possíveis

alterações macroscópicas. Amostras de diversos órgãos, tais como sistema nervoso central, coração, musculatura esquelética, fígado, pulmão, rim, baço, linfonodos, timo, língua, intestino, ovário, testículo e pele, foram coletadas e fixadas em formalina 10% tamponada para a análise histopatológica e imuno-histoquímica. Amostras do lobo frontal cerebral e ápice cardíaco de todos os fetos e natimortos foram coletadas, congeladas e armazenadas a -20°C, e foram submetidas à PCR para *N. caninum* e *T. gondii* e posterior sequenciamento. Fragmentos das placentas das 15 cabras foram coletados e fixados em formalina 10% tamponada para análise histopatológica e imuno-histoquímica, também foram congelados e armazenados a -20°C para detecção molecular de *N. caninum* e *T. gondii*. Sete das 11 cabras soropositivas geraram caprinos congenitamente infectados por *N. caninum*.

2.2. Análise histopatológica e imuno-histoquímica

As amostras fixadas em formalina a 10% foram processadas pelos métodos rotineiros de análise histopatológica e emblocadas em parafina. Secções de 5µm foram desparafinadas, rehidratadas, coradas com hematoxilina e eosina (HE) e examinadas pela microscopia óptica. Os órgãos foram examinados com intuito de verificar lesões causadas por protozoários, bem como identificar possíveis estruturas parasitárias. No SNC, a análise microscópica foi realizada

nas áreas de córtex cerebral, tálamo, colículo rostral, colículo caudal, pedúnculo cerebelar, bulbo ao nível do óbex, e cerebello.

As mesmas amostras avaliadas pela análise histopatológica também foram submetidas à análise imuno-histoquímica. Esta foi realizada utilizando-se a técnica de biotina-estreptavidina-peroxidase, semelhantemente ao descrito por Pescador et al. (2007). Os cortes histológicos em lâminas tratadas com silane, após desparafinados e reidratados, foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos. Os antígenos de protozoários foram recuperados por meio de digestão enzimática com tripsina 0,1% (pH 7,8) por 10 minutos a 37°C, seguida pela recuperação com calor por 2 minutos em tampão citrato (pH 6,0). Para o bloqueio de reações inespecíficas, os cortes foram submergidos em solução de leite desnatado (Molico[®], Nestlé) diluído em PBS a 5% por uma hora. As lâminas foram incubadas por uma hora a 37°C com anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum* em diluição 1:2000 ou anti-*T. gondii* como diagnóstico diferencial (VMRD, Pullman, USA) na mesma diluição. Anticorpos secundários biotinizados (Dako, Carpinteria, CA) foram aplicados, seguidos pelo complexo avidina-biotina peroxidase (Dako), ambos por 20 minutos na temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram submetidas ao cromógeno Vector Red (Vector NovaRed[®]), conforme as instruções do fabricante, e posteriormente contra coradas com hematoxilina.

Secções de cerebelo e tronco cerebral contendo cistos de *N. caninum* (Varaschin et al., 2012) e *T. gondii* provenientes da rotina de diagnóstico, foram utilizadas como controlos positivos. Como controlos negativos os anticorpos primários foram substituídos por soros homólogos não imunes. Os cortes foram considerados positivos quando possuíam estruturas consistentes com a morfologia do parasito e que foram fortemente coradas pelo método imunohistoquímico descrito.

2.3. Extração do DNA, reacção em cadeia da polimerase (PCR) para N. caninum e T. gondii e sequenciamento genético

O DNA foi extraído de 40mg de tecido, a partir de todas as amostras dos fetos e natimortos, assim como das placentas, que foram congeladas e armazenadas a -20°C. A extração foi realizada utilizando-se kit comercial (Wizard SV Genomic DNA Purification System, Promega, Madison, USA), por meio da técnica de lise por proteinase K, segundo as recomendações do fabricante. O DNA extraído das amostras foi quantificado por espectrofotometria e gel de agarose, e foi armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR.

Para a detecção de *N. caninum* e *T. gondii*, a região ITS-1 do rDNA foi utilizada como alvo para amplificação. Para isto, foram utilizados os primers

Lav 1 (Forward) 5'-CGG AAG GAT CAT TCA CAC G-3' e Tim 11 (Reverse) 5' -CCC ACT GAA ACA GAC GTA CC-3', os quais amplificam um fragmento esperado de 588pb, situado entre as posições 4 e 592 dentro da região do DNA ribossomal de *N. caninum* e *T. gondii* (Payne and Ellis, 1996; Santos et al., 2011).

Os reagentes padrões para as reações foram utilizados (Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase; set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega, Madison, USA). O volume final das reações foi ajustado para 20 µL, e as condições definidas para a PCR em cada reação foram: 4µL de Tampão da Taq-polimerase (5x Green GoTaq Flexi Buffer), 1,2µL MgCl₂ 25mM, 2,5mM dNTPs, 0,5U Taq DNA Polimerase, 10µM de cada primer e 100ng de DNA template. Como controle branco, o DNA template foi substituído por água ultra pura Milli-Q, e como controle positivo, foi utilizada amostra de placenta de cabra naturalmente infectada (Varaschin et al., 2012). As reações foram realizadas em termociclador PT100 (MJ Research Incorporated, USA), utilizando as condições: 95°C por cinco minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação e abertura das fitas de DNA), alinhamento dos primers a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; e extensão final por sete minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA, pH 8,0; Tris 0,09M, ácido

bórico 0,09M, EDTA 2mM), por uma hora a 100V. No transiluminador, visualizaram-se as bandas de DNA, utilizando-se SYBR Green (SYBR[®] Green I Nucleic Acid Gel Stain; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) ou brometo de etídeo 0,5µg/mL (Sigma-Aldrich #E-1510) e comparadas a um marcador molecular 100pb ou 1Kpb (DNA ladder, Promega, Madison, USA). Para análise e edição, as imagens foram capturadas (L-Pix Chemi Photo Digitizer; Loccus Biotecnologia, Brazil).

Para realizar a diferenciação entre *N. caninum* e *T. gondii*, os “amplicons” de alguns tecidos selecionados por amostragem, foram quantificados por espectrofotometria, e submetidos ao sequenciamento genético através da técnica de dideoxi (Sanger et al., 1977). Utilizou-se sequenciador automatizado (Laboratório Central de Biologia Molecular-UFLA), para subsequente confirmação da especificidade e similaridade, utilizando-se o programa BLAST (NCBI) e comparando com sequências depositadas no GenBank[®].

3. Resultados

Na necropsia dos fetos abortados e dos natimortos não foram observadas lesões significativas, bem como na análise macroscópica das placentas pertencentes à Cabra 1 e 2, e dos caprinos que geraram conceptos saudáveis. As

lesões histopatológicas foram observadas somente em dois fetos abortados (Feto 1 e 4) e nos dois natimortos, sendo que no Feto 1 e 4 estavam presentes principalmente no sistema nervoso central, coração e musculatura estriada esquelética, ao passo que nos natimortos, as lesões se encontravam somente no sistema nervoso central (Tabela 4).

No feto 4, as lesões no sistema nervoso central estavam presentes no bulbo ao nível do óbex, pedúnculos cerebelares, colículo rostral e tálamo, e eram caracterizadas por infiltrados multifocais, ocasionalmente localmente extensivos, compostos primariamente de células mononucleares e células da glia. Foram observados raros manguitos perivasculares compostos primariamente por plasmócitos e linfócitos e raras áreas focais de meningite não purulenta. Áreas de necrose multifocais, associados a células mononucleares e células da glia, também estavam presentes, além de congestão difusa acentuada. No tálamo, havia raros cistos protozoários contendo bradizoítos, localizados no neurópilo, associados ou não às áreas de inflamação. Estes cistos mediram de 14,1 x 12,6 µm a 15,2 x 13,5 µm, com as paredes variando de 0,5 a 0,6 µm de espessura e que foram fortemente corados na análise imuno-histoquímica quando utilizado o anticorpo anti-*N. caninum*, ao passo que a imuno-histoquímica para anti-*T. gondii* foi negativa. Não foram visualizadas lesões em córtex cerebral e cerebelo. No coração havia miocardite não supurativa multifocal a coalescente

acentuada (Figura 1) e também foi visualizada uma miosite não supurativa multifocal moderada. Na coloração de HE não foram observadas estruturas parasitárias no coração e músculo estriado esquelético, no entanto ocasionais grupos de taquizoítos localizados entre as fibras musculares, mais numerosos no coração, foram evidenciados pela forte marcação imuno-histoquímica anti-*N. caninum* (Figura 2), sendo negativos para o anticorpo anti-*T. gondii*. No fígado havia também infiltrado inflamatório, composto principalmente por linfócitos e plasmócitos, periportal multifocal moderado. Nos demais órgãos não foram visualizadas lesões significativas ou estruturas parasitárias. No Feto 1 as lesões no sistema nervoso foram semelhantes àquelas encontradas no Feto 4, no entanto estavam localizadas principalmente no bulbo ao nível do óbex. O Feto 1 também apresentou uma miosite não supurativa multifocal moderada, porém com necrose segmentar discreta de miofibrilas. No coração deste feto, o infiltrado inflamatório mononuclear era discreto. No Feto 1 não foram visualizadas estruturas parasitárias no HE e nem na análise imuno-histoquímica para *N. caninum*.

Nos natimortos, as lesões foram semelhantes entre eles, e as mesmas estavam presentes somente no sistema nervoso central. As lesões observadas nos natimortos foram semelhantes àquelas encontradas no sistema nervoso central do Feto 1 e 4, entretanto, a área mais afetada, ao contrário do observado no Feto

1 e 4, foi o córtex cerebral. No córtex cerebral dos dois natimortos havia inúmeras áreas multifocais de inflamação mononuclear, associadas a células da glia. Os focos de necrose, associados a inflamação mononuclear (Figura 3), estavam presentes em maior número se comparados aos fetos abortados. Em raros focos necróticos foram visualizados debris basofílicos mineralizados. Estas áreas de inflamação e necrose no córtex cerebral se encontravam principalmente na substância cinzenta, e ocasionalmente na substância branca. Áreas focais de meningite não supurativa e manguitos perivascularares, compostos principalmente por linfócitos e macrófagos, também foram observados. Nos colículos rostral e caudal foram visualizadas raras áreas focais de gliose. Não foram observadas outras lesões significativas em cerebelo, pedúnculos cerebelares e tálamo além de uma congestão difusa acentuada. Numerosos cistos protozoários contendo bradizoítos delgados foram visualizados nos dois natimortos principalmente no córtex cerebral, próximo ou não às áreas de inflamação. Raros cistos foram observados nos colículos rostral e caudal do Natimorto 1 (Figura 4). Os cistos presentes nos natimortos foram relativamente maiores do que aqueles observados no Feto 1 e 4, e variaram em tamanho de 14,0 x 14,4 μm a 23,3 x 23,1 μm . As paredes também apresentavam espessura maior, variando de 0,9 a 2,0 μm . Todos os cistos apresentaram forte marcação imuno-histoquímica para *N. caninum* (Figura 5), e foram negativos para *T. gondii*. No coração e

musculatura estriada esquelética, assim como nos outros órgãos coletados, não foram observadas lesões ou estruturas parasitárias. Taquizoítos não foram visualizados nos tecidos analisados dos natimortos.

Na PCR dos fetos e natimortos, o DNA de *N. caninum* foi detectado nas amostras de córtex cerebral e coração do Feto 4 e 3, no fragmento de coração do Feto 1, ao passo que o Feto 2 não apresentou bandas visíveis à eletroforese. Nos natimortos, o DNA de *N. caninum* foi detectado somente nas amostras de córtex cerebral (Tabela 4 e 6).

Ambas as placentas (Cabra 1 e 2) continham lesões (Tabela 5). A placenta da Cabra 1, nos cotilédones, foram visualizadas áreas multifocais, por vezes focalmente extensas, de necrose acentuada, localizada principalmente nas regiões dos vilos cório-alantóicos, envolvendo as células trofoblásticas e o mesênquima (Figura 6 e 7). Estas áreas eram caracterizadas por perda da arquitetura do tecido, eosinofilia, debris celulares associados a raros focos de calcificação, picnose nuclear e discreto infiltrado inflamatório neutrofílico. Foi observado também um infiltrado inflamatório multifocal, composto principalmente por plasmócitos, linfócitos, macrófagos e raros neutrófilos, situado no interstício, ao redor de vasos sanguíneos e abaixo da superfície coriônica. Na placenta da Cabra 2 foi visualizada áreas de necrose semelhantes àquelas descritas para Cabra 1, no entanto o infiltrado inflamatório neutrofílico

associado era moderado, e além disso, havia áreas multifocais e extensas de calcificação. Nestas duas placentas o DNA do *N. caninum* foi detectado (Tabela 6), no entanto, na análise imuno-histoquímica, não foram observadas estruturas parasitárias marcadas para *N. caninum*.

Das onze placentas oriundas das cabras soropositivas que geraram conceptos saudáveis, em sete o DNA do *N. caninum* foi detectado (Tabela 5 e 6). Destas sete, as lesões histopatológicas foram observadas em cinco delas. Em uma, havia um infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, multifocal moderado situado principalmente no mesênquima dos vilos córion-alantóicos, além de raros focos necróticos com debris celulares basofílicos (calcificação). Nesta placenta observaram-se grupos de taquizoítos, localizados no interstício, os quais foram fortemente marcados na imuno-histoquímica para *N. caninum* (Figura 8). Em duas placentas, foi visualizado um infiltrado inflamatório mononuclear multifocal leve, e em outras duas, raros focos de inflamação mononuclear foram observados. Nas demais placentas das cabras soropositivas e soronegativas não foram visualizadas lesões histopatológicas significativas. Nas placentas das duas cabras soronegativas o DNA de *N. caninum* também não foi detectado.

4. Discussão

As lesões histopatológicas observadas em dois fetos abortados e dois natimortos do presente estudo são consistentes com uma infecção por protozoário. Além do *N. caninum*, outros protozoários tais como *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. podem causar abortos e natimortos em cabras e outros ruminantes (Dubey, 1981; Hong et al., 1982; Barr et al., 1990; Barr et al., 1991; Dubey et al., 1992; Dubey et al.; 1996). As estruturas parasitárias visualizadas nos fetos e natimortos do presente estudo são morfológicamente distintas das espécies de *Sarcocystis*. *N. caninum* e *T. gondii* são estruturalmente diferentes de espécies de *Sarcocystis*, os quais formam esquizontes imaturos que contém núcleos acentuadamente lobulados ou divididos e que podem ser observados anteriormente à produção de merozoítos (Dubey et al., 2001). Além disso, espécies de *Sarcocystis* podem formar esquizontes localizados no endotélio vascular (Hamir et al., 1997), fato este não observado no presente estudo. Apesar do *N. caninum* e *T. gondii* poderem ser diferenciados morfológicamente (Dubey et al., 2002), os mesmos podem apresentar estruturas semelhantes. No presente estudo, a diferenciação entre estes dois protozoários foi baseada nos aspectos morfológicos, e principalmente no tipo de marcação imuno-histoquímica e características moleculares do parasito. Morfológicamente é possível diferenciar o *N. caninum* de *T. gondii* por meio da espessura da parede do cisto, sendo que a

mesma no *T. gondii* é menor que $0,5\mu\text{m}$, ao passo que no *N. caninum* pode chegar até $4\mu\text{m}$ (Dubey et al., 2002). As espessuras das paredes observadas nos dois fetos abortados, do presente estudo, variaram de $0,5$ a $0,6\mu\text{m}$. Embora sejam menores que aquelas relatadas para *N. caninum*, este fato também foi observado em aborto em cabra naturalmente infectada (Dubey et al., 1996), além de serem definitivamente maiores do que aquelas relatadas para *T. gondii* ($<0,5\mu\text{m}$). Nos natimortos, as espessuras das paredes foram maiores e variaram de $0,9$ a $2,0\mu\text{m}$, semelhantemente ao observado em natimorto caprino (Dubey et al., 1992), sendo que a maioria dos cistos de *N. caninum* possui espessura entre 1 e $2\mu\text{m}$ (Dubey and Lindsay, 1996). O tamanho dos cistos nos fetos abortados e natimortos foram semelhantes àqueles descritos em caprinos (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1996; Coberllini et al., 2001; Varaschin et al., 2012). Em abortos caprinos associados ao *N. caninum* são descritos numerosos cistos protozoários no sistema nervoso central (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1996; Varaschin et al., 2012). Este fato difere do presente estudo, pois no Feto 4, o qual possuía lesões acentuadas, foram visualizados raros cistos, detectados somente ao nível do tálamo. No Feto 1, apesar de ter apresentado lesões no sistema nervoso central, não foram encontrados cistos. Os cistos de *N. caninum* nem sempre estão presentes em todas as secções de lesão (Dubey and Lindsay, 1996). Apesar dos dois fetos terem apresentado lesões no coração e musculatura estriada

esquelética, taquizoítos, evidenciados pela marcação imuno-histoquímica, foram observados no coração e musculatura estriada esquelética somente do Feto 4. Diferentemente, no coração de caprinos naturalmente infectados foram detectados cistos (Barr et al., 1992; Varaschin et al., 2012), sendo que taquizoítos também são relatados no sistema nervoso central (Dubey et al., 1996). Nos natimortos, taquizoítos não foram visualizados, sendo que somente cistos bem desenvolvidos foram observados, o que pode indicar uma infecção crônica (Dubey et al., 1992).

As lesões histopatológicas, apesar de semelhantes, demonstraram padrões distintos nos fetos abortados e natimortos, principalmente no que tange à localização das mesmas. De quatro fetos abortados oriundos de uma mesma cabra, somente dois fetos apresentaram lesões. Nestes dois fetos, a encefalite não supurativa multifocal associada a células da glia, os raros focos necróticos, bem como os manguitos perivascularares e a meningite não supurativa estavam localizados nas áreas do tronco cerebral, sendo mais acentuadas no Feto 4. Diferentemente, em um feto caprino abortado, as lesões estavam presentes tanto no córtex cerebral como no tronco encefálico, sendo mais acentuadas na substância branca próxima aos ventrículos laterais (Dubey et al., 1996). Nos natimortos as lesões se situavam predominantemente ao nível de córtex cerebral, principalmente na substância cinzenta, embora raras áreas de encefalite não

supurativa associadas a células da glia também tenham sido observadas em diferentes níveis de tronco encefálico. Em natimorto caprino, as lesões também foram observadas na substância cinzenta cortical, no entanto eram mais severas ao nível de mesencéfalo (Dubey et al., 1992). Miocardite e miosite não supurativas foram visualizadas nos dois fetos abortados, fato este também observado em abortos caprinos (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1996). Nos natimortos não foram observadas lesões no coração e musculatura estriada esquelética, semelhantemente ao descrito em natimorto caprino (Dubey et al., 1992). Lesões em outros órgãos tais como fígado, pulmões também são relatadas (Dubey et al., 1996; Coberllini et al., 2001), sendo que somente no Feto 4 havia uma hepatite não supurativa periportal moderada.

Na análise imuno-histoquímica foi visualizada intensa marcação para *N. caninum* tanto de cistos como de taquizoítos do Feto 4, como nos cistos protozoários dos natimortos, sendo negativas para *T. gondii*. O DNA de *N. caninum* foi detectado nas amostras de córtex cerebral e coração dos Fetos 3 e 4, nas amostras de córtex cerebral dos dois natimortos, e no coração do Feto 1. No Feto 4, houve correlação entre os resultados da imuno-histoquímica e sequenciamento genético. Ao passo que no Feto 1, não foi observada marcação imuno-histoquímica no coração e cérebro, sendo que o DNA de *N. caninum* foi detectado somente nas amostras de coração. Muito provavelmente a área

selecionada (córtex cerebral), no Feto 1, não foi demonstrativa, uma vez que na mesma não foram observadas lesões. Nos natimortos, houve correlação entre os resultados do sequenciamento genético com a imuno-histoquímica. Estes dois testes foram positivos somente nas amostras de córtex cerebral, nas quais foram observadas lesões significativas na análise histopatológica. As amostras de coração dos dois natimortos, as quais não apresentaram lesões, foram negativas na imuno-histoquímica e PCR. Embora o Feto 3 não tenha apresentado lesões, neste o DNA de *N. caninum* foi detectado nas amostras de coração e córtex cerebral. Semelhantemente, a presença do DNA de *N. caninum* em feto caprino abortado e que não apresentou lesões foi relatada (Moreno et al., 2012).

Nas placentas de caprinos naturalmente infectados por *N. caninum*, são descritas somente lesões inflamatórias, e por vezes leves (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1992). Diferentemente, no presente estudo, nas placentas da Cabra 1 e 2 foram visualizadas lesões severas. Além das áreas de inflamação observadas principalmente na Cabra 1, as lesões consistiam predominantemente de áreas de necrose, multifocais, por vezes focalmente extensas, situadas predominantemente nos vilos cório-alantóicos, envolvendo o mesênquima e as células trofoblásticas. Na Cabra 2 foi possível observar áreas necróticas associadas a extensa calcificação e infiltrado predominantemente neutrofílico moderado. Lesões semelhantes têm sido descritas em fetos bovinos naturalmente

(Barr et al., 1991) e experimentalmente infectados (Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2006; Gibney et al., 2008), e em ovinos experimentalmente infectados (Buxton et al., 1998). Embora a patogênese do aborto na neosporose ainda não esteja completamente elucidada, lesões necróticas e inflamatórias na placenta e no feto estão correlacionadas com a morte fetal em bovinos (Gibney et al., 2008). No presente estudo, a necrose e inflamação observadas na placenta da Cabra 1 muito provavelmente contribuíram para a ocorrência do aborto. O aporte insuficiente de oxigênio decorrente da insuficiência placentária pode induzir a liberação do hormônio adrenocorticotrófico fetal, com consequentemente aumento de cortisol fetal e prostaglandina placentária. Este mecanismo pode ser responsável por abortos tardios ou pelo nascimento de bezerros prematuros infectados por *N. caninum* (Dubey et al., 2006), e no presente estudo, associado às lesões fetais, pode ter sido responsável pela ocorrência dos natimortos. Nas placentas de outras cinco cabras naturalmente infectadas foram observadas lesões, caracteristicamente leve em quatro e moderada em uma. No entanto, apesar de terem sido visualizadas lesões, os conceptos oriundos destas cabras nasceram clinicamente normais.

O DNA de *N. caninum* foi detectado nas placentas da Cabra 1 e 2, entretanto não se observou marcação imuno-histoquímica para *N. caninum* nas mesmas. No entanto, em uma cabra do presente estudo, naturalmente infectada

por *N. caninum* e que gerou um concepto saudável, porém congenitamente infectado, grupos de taquizoítos puderam ser identificados tanto nas secções de HE como na análise imuno-histoquímica. Estes grupos de taquizoítos se localizavam predominantemente no interstício dos vilos cório-alantóicos e foram marcados intensamente pelo anticorpo anti-*N. caninum*. Por meio da análise imuno-histoquímica, em bovinos e ovinos experimentalmente infectados, foi possível detectar a presença de estruturas compatíveis com taquizoítos e antígenos na placenta (Buxton et al., 1998; Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2006; Gibney et al., 2008), fato este até então não demonstrado em placenta de cabra naturalmente infectada. Sete, das onze placentas das cabras naturalmente infectadas e que geraram conceptos saudáveis foram positivas para *N. caninum* na PCR e confirmadas por meio de sequenciamento. Destas sete cabras, em que o DNA de *N. caninum* foi detectado, todas geraram conceptos infectados. Semelhantemente, *N. caninum* foi detectado por meio de ensaio biológico na placenta de bovinos que geraram conceptos normais, porém congenitamente infectados (Fioretti et al., 2003). Das quatro cabras em cujas placentas não foi detectado o DNA de *N. caninum*, três tiveram conceptos não infectados, semelhantemente ao observado na cabra soronegativa. Considerando todas as treze placentas analisadas, o DNA de *N. caninum* foi detectado em nove delas, ao passo que somente uma foi positiva na imuno-histoquímica. Em estudo

prévio, a PCR para *N. caninum* apresentou maior sensibilidade quando comparada à imuno-histoquímica (van Maanen et al., 2004). Embora marcações de antígenos de *N. caninum* têm sido relatadas nas placentas de animais experimentalmente infectados (Buxton et al., 1998; Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2006; Gibney et al., 2008), no presente estudo, a não visualização de estruturas parasitárias íntegras após um exame microscópico detalhado, muito provavelmente contribuiu para esta baixa positividade na análise imuno-histoquímica das placentas.

O presente estudo demonstra que a infecção transplacentária do *N. caninum* ocorre em caprinos, sendo que este protozoário é potencialmente causador de abortos e natimortos em cabras, cursando com lesões severas nos fetos, natimortos e placenta. A utilização de mais de uma técnica diagnóstica (PCR e imuno-histoquímica) mostrou-se eficiente na detecção do *N. caninum* nos fetos, natimortos, e principalmente quando se trata de placentas de cabras naturalmente infectadas.

Agradecimentos

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

5. Referências

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

Barr, B.C., Anderson, M.L., Dubey, J.P., Conrad, P.A., 1991. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28, 110-113.

Barr, B.C., Anderson, M.L., Woods, L.W., Dubey, J.P., Conrad, P.A., 1992. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 365-367.

Bjerkås, I., Mohn, S.F., Presthus, J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70, 271-274.

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

Buxton, D., Maley, S.W., Wright, S., Thomson, K.M., Rae, A.G., Innes, E.A., 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.* 118, 267-279.

Coberllini, L.G., Colodel, E.M., Driemeier, D., 2001. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 416-419.

Czopowicz, M., Kaba, J., Szaluś-Jordanow, O., Nowicki, M., Witkowski, L., Frymus, T., 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. *Vet. Parasitol.* 178, 339-341.

Dubey, J.P., 1981. Epizootic toxoplasmosis associated with abortion in dairy goats in Montana. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178, 661-670.

Dubey, J.P., Acland, H.M., Hamir, N.A., 1992. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. *J. Parasitol.* 78, 532-534.

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

Dubey, J.P., Morales, J.A., Villalobos, P., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Topper, M.J., 1996. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 263-265.

Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Saville, W.J.A., Reed, S.M., Granstrom, D.E., Speer, C.A., 2001. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet. Parasitol.* 95, 89-131.

Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.E., Howe, D.K., Jenkins, M.C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A.E., Mattsson, J.G., McAllister, M.M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L.D., Speer, C.A., Tress, A.J., Uggl, A., Upton, S.J., Williams, D.J.L., Lindsay, D.S., 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. *Int. J. Parasitol.* 32, 929-946.

Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41, 1-16.

Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W., 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.* 134, 267-289.

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

Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals-The last five years. Vet. Parasitol. 180, 90-108.

Eleni, C., Crotti, S., Manuali, E., Costarelli, S., Filippini, G., Moscati, L., Magnino, S., 2004. Detection of *Neospora caninum* in na aborted goat foetus. Vet. Parasitol. 123, 271-274.

Fioretti, D.P., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V., Rosignoli, L., 2003. Neospora caninum infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the forth gestation. J. Vet. Med. 50, 399-404.

Gibney, E.H., Kipar, A., Rosbottom, A., Guy, C.S., Smith, R.F., Hetzel, U., Trees, A.J., Williams, D.J.L., 2008. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. Int. J. Parasitol. 38, 579-588.

Hamir, A.N., Gerros, T.C., Dubey, J.P., 1997. Pyogranulomatous encephalitis associated with an unidentified *Sarcocystis neurona*-like organism in a horse. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 331-333.

Hong, C.B., Giles, R.C.Jr., Newman, L.E., Fayer, R., 1982. Sarcocystosis in an aborted bovine fetus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181, 585-588.

Macaldowie, C., Maley, S.W., Wright, S., Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Innes, E.A., 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. J. Comp. Pathol. 131, 142-156.

Maley, S.W., Buxton, D., Macaldowie, C.N., Anderson, I.E., Wright, S.E., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Hamilton, C.M., Storset, S.K., Innes, E.A., 2006. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. J. Comp. Pathol. 135, 130-141.

Modolo, J.R., Stachissini, A.V.M., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Langoni, H., Padovani, C.R., Barrozo, L.V., Leite, B.L.S., 2008. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq. Vet. Bras. 28, 597-600.

Moreno, B., Collantes-Fernández, E., Villa, A., Navarro, A., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* (in press)

Payne, S., Ellis, J., 1996. Detection of *Neospora caninum* DNA by polymerase chain reaction. *Int. J. Parasitol.* 26, 347-351.

Pescador, C.A., Coberllini, L.G., Oliveira, E.C., Raymundo, D.L., Driemeier, D., 2007. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *Vet. Parasitol.* 150, 159-163.

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

Santos, D.S., Andrade, M.P., Varaschin, M.S., Guimarães, A.M., Hirsch, C., 2011. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20, 281-288.

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

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

Varaschin, M.S., Guimarães, A.M., Hirsch, C., Mesquita, L.P., Abreu, C.C., Rocha, C.M.B.M., Wouters, F., Moreira, M.C., 2011. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. Pesq. Vet. Bras. 31, 53-58.

Varaschin, M.S., Hirsch, C., Wouters, F., Nakagaki, K.Y., Guimarães, A.M., Santos, D.S., Bezerra Jr., P.S., Costa, R.C., Peconick, A.P., Langohr, I.M., 2012. Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. Korean J. Parasitol. 50, 63-67.

Tabela 4 – Intensidade das lesões histopatológicas nos fetos abortados e natimortos.

Tecidos	Fetos				Natimortos	
	1	2	3	4	1	2
Córtex	-	-	- ¹	- ¹	+++ ^{1,2}	+++ ^{1,2}
Tálamo	++	-	-	+++ ²	-	-
Colículo rostral	-	-	-	+++	+ ²	+ ²
Sistema nervoso central						
Colículo caudal	-	-	-	na	+ ²	+ ²
Pedúnculo cerebelar	na	-	-	+++	-	-
Bulbo ao nível do óbex	-	-	-	+++	na	na
Cerebelo	-	-	-	-	-	-
Coração	+ ¹	-	- ¹	+++ ^{1,2}	-	-
Musculatura estriada esquelética	++	-	-	++ ²	-	-

Intensidade das lesões: + leve; ++ moderada; +++ acentuada; - ausente. ¹Amostras positivas na PCR (neste teste foram avaliadas as amostras de córtex e coração). ²Amostras positivas na imuno-histoquímica para *N. caninum*. na – amostras não avaliadas.

Tabela 5 – Análise histopatológica, molecular e imuno-histoquímica das placentas provenientes de 15 caprinos.

Placenta	PCR	Imuno-histoquímica	Lesões histopatológicas
1	+	-	+++
2	+	-	+++
3	+	+	++
4	+	-	+
5	+	-	+
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	-
9	+	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14 ^a	-	-	-
15 ^a	-	-	-

^aCabras soronegativas. Resultados PCR e imuno-histoquímica: + positivo; - negativo. Intensidade das lesões: + leve; ++ moderada; +++ acentuada; - ausente.

Tabela 6 – Análise do sequenciamento genético de amostras positivas na PCR.

Amostras analisadas	Número BLAST/GenBank
Placenta 1	69AJ3DUN014
Placenta 3	69AB5KGT014
Placenta 8	HQ323749.1
Natimorto 1	69A5JGJ3014
Natimorto 2	69A9AS3U015

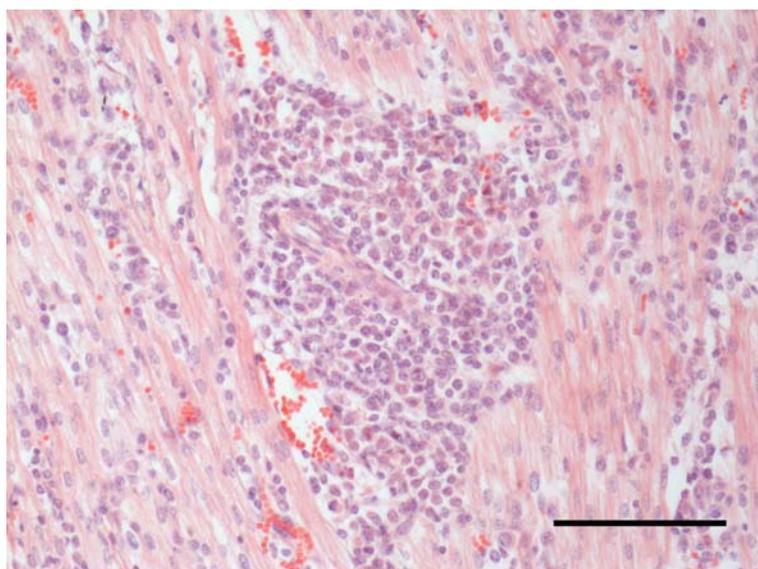


Figura 1 – Neosporose em caprinos. Feto 4, coração, presença de infiltrado inflamatório mononuclear acentuado, localizado entre os miócitos. HE. Barra: 100 μ m.

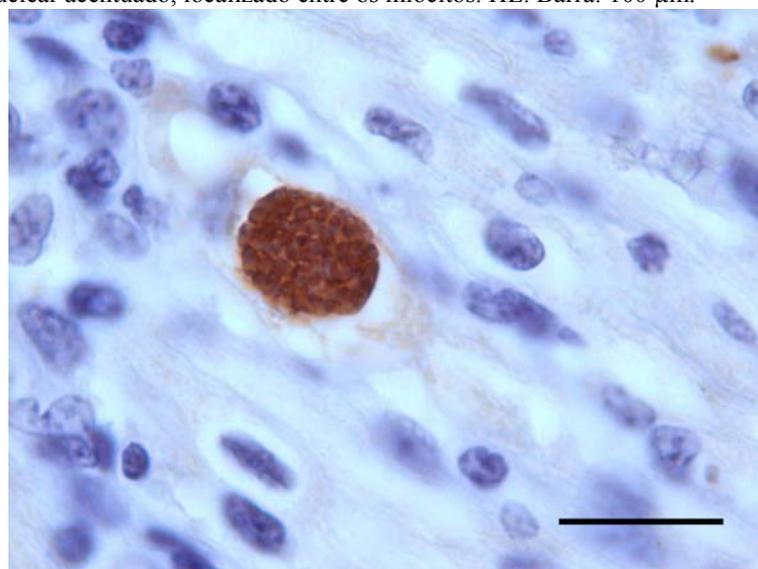


Figura 2 – Neosporose em caprinos. Feto 4, coração, grupo de taquizoítos entre os miócitos e marcados na imuno-histoquímica para *N. caninum*. Método biotina-estreptavidina-peroxidase, Vector Red[®]. Barra 20 μ m.

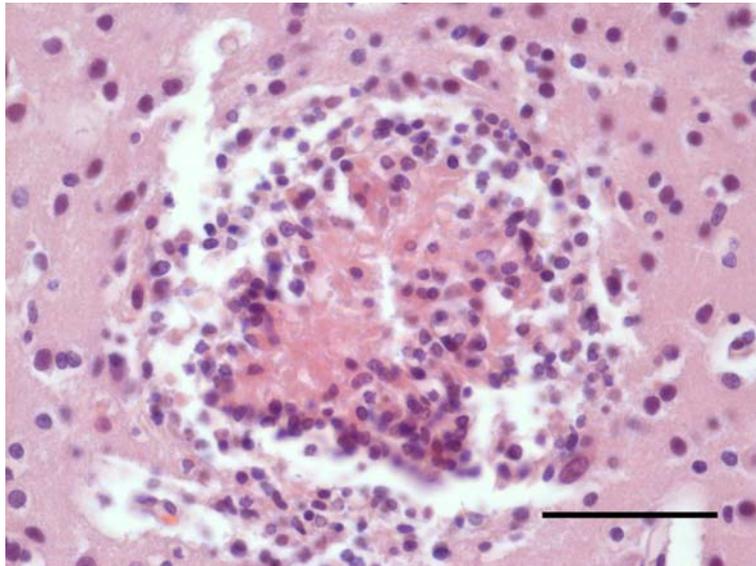


Figura 3 – Neosporose em caprinos. Natimorto 2, encéfalo, córtex cerebral, área de necrose associada a inflamação mononuclear e células da glia. HE. Barra: 50 μ m.

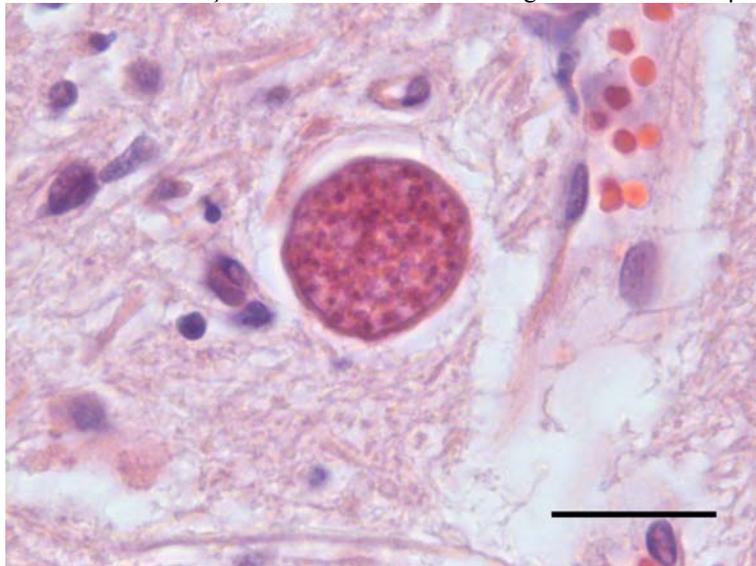


Figura 4 – Neosporose em caprinos. Natimorto 1, encéfalo, colículo rostral, presença de cisto protozoário de parede espessa, não associado a inflamação. HE. Barra: 20 μ m.

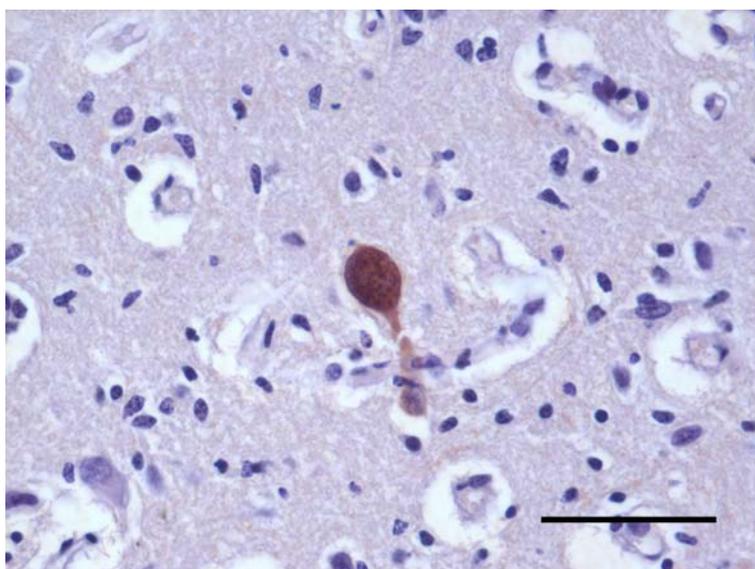


Figura 5 – Neosporose em caprinos. Natimorto 1, encéfalo, colículo caudal, visualiza-se cisto protozoário fortemente marcado na imuno-histoquímica para *N. caninum*. Método biotina-estreptavidina-peroxidase, Vector Red[®]. Barra: 50 µm.

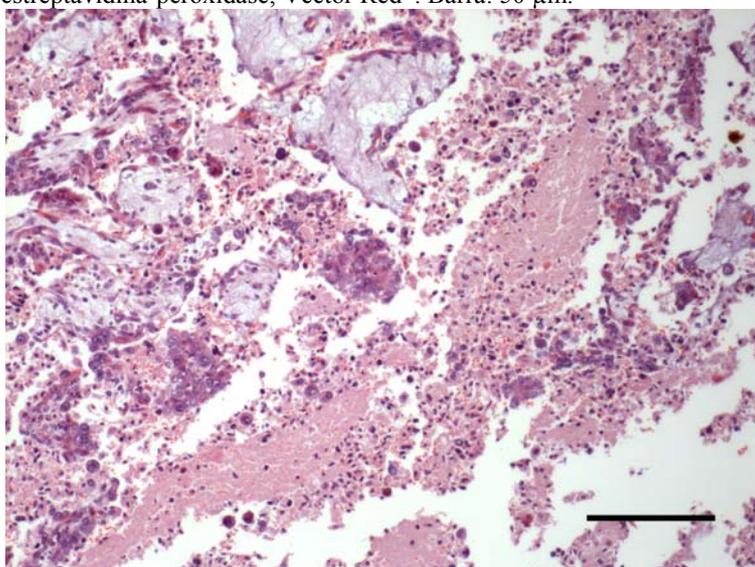


Figura 6 – Neosporose em caprinos. Cabra 1, placenta, presença de extensa área de necrose, caracterizada por eosinofilia e debris celulares. HE. Barra: 150 µm.

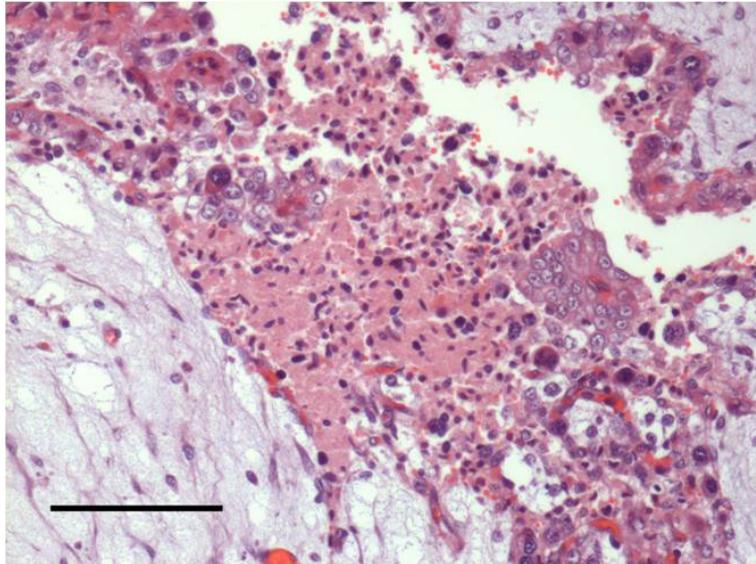


Figura 7 – Neosporose em caprinos. Cabra 1, placenta, vilo cório-alantoico, área de necrose envolvendo o mesênquima e trofoblasto. HE. Barra: 100 μ m.

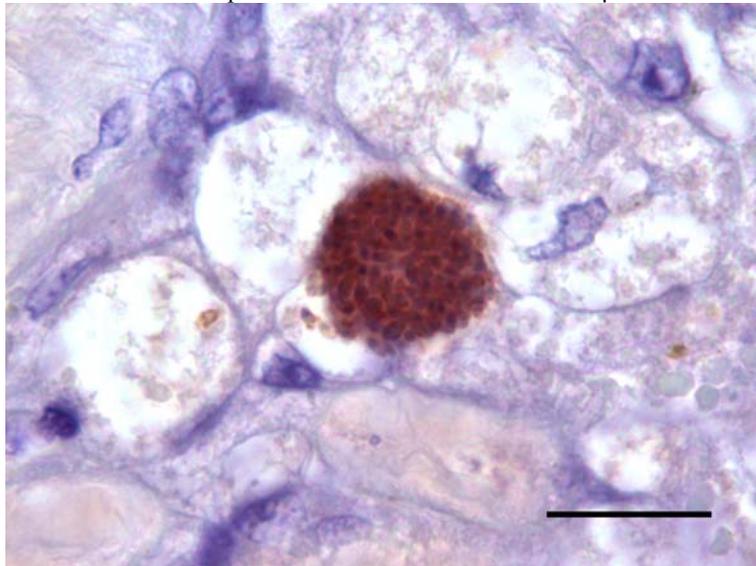


Figura 8 - Neosporose em caprinos. Em placenta de cabra soropositiva observa-se grupo de taquizoítos no interstício, fortemente marcados na imuno-histoquímica para *N. caninum*. Método biotina-estreptavidina-peroxidase, Vector Red[®]. Barra: 20 μ m.