ANDREAS LAZAROS CHRYSSAFIDIS

Avaliação da infecção experimental por *Neospora caninum* em
fêmeas bubalinas e bovinas, no terço inicial da gestação

São Paulo

2012

ANDREAS LAZAROS CHRYSSAFIDIS

Avaliação da infecção experimental por *Neospora caninum* em fêmeas
bubalinas e bovinas, no terço inicial da gestação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2555
FMVZ

Chrysafidis, Andreas Lazaros

Avaliação da infecção experimental por *Neospora caninum* em fêmeas bubalinas e bovinas, no terço inicial da gestação / Andreas Lazaros Chrysafidis. -- 2012. 127 p.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. *Neospora caninum*. 2. Búfala. 3. Vaca. 4. Abortamento. 5. Isolados. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação da infecção experimental por *Neospora caninum* em fêmeas bubalinas e bovinas nos diferentes estágios da gestação”, protocolado sob o nº1186/2007, utilizando 30 (trinta) bubalinas e bovinas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/09/07.

We certify that the Research “Evaluation of experimental infection with *Neospora caninum* in water buffaloes and cattle at different stages of gestation”, protocol number 1186/2007, utilizing 30 (thirty) bubalines and bovines, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/19/07.

São Paulo, 19 de setembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome: CHRYSSAFIDIS, Andreas Lazaros

Título: Avaliação da infecção experimental por *Neospora caninum* em fêmeas bubalinas e bovinas, no terço inicial da gestação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

À MEMÓRIA DE MINHA MÃE
MARY CHRYSSAFIDIS, PELO EXEMPLO
DE VIDA E GARRA QUE SEMPRE ME GUIARÁ.
“MEU MAIOR TESOURO É MINHA VONTADE DE VENCER”.

À MARIANA,
PELO ETERNO COMPANHEIRISMO.

À HELENA,
POR TORNAR OS DIAS
MAIS BELOS A CADA SORRISO.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e à minha família pelo amor – meus pilares de sustentação.

À Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari por tudo o que aprendi tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Lembrarei com saudades de todos os momentos vividos durante o doutorado e serei eternamente grato por todas as oportunidades que me foram oferecidas. Que Deus sempre te ilumine.

À Prof^a Dr^a Lee Innes e sua família pela orientação e pelo acolhimento tão gentil durante o período na Escócia.

Ao Prof Dr Rodrigo Martins Soares e os técnicos Antônio e José Roberto pelo auxílio com os animais em Pirassununga.

Ao Prof Dr Ed Hoffmann Madureira e sua equipe técnica pela ajuda com o manejo reprodutivo dos animais.

Aos colegas do VPS pela contribuição e pelos momentos agradáveis que tivemos juntos.

Aos amigos do *Moredun Research Institute*, German, Charline, Yvonne, Lara, Thomas e Stephen pelos cafés mais divertidos do mundo. *Cheers!*

Aos meus grandes amigos/irmãos Mairun e Murilo por estarem sempre ao meu lado, com a mão estendida se necessário for.

À todas as pessoas que estiveram no meu caminho e puderam acompanhar parte da história que me levou até este momento de realização.

Este trabalho contou com apoio financeiro da Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) para o projeto (processo nº 2007/3592-7) e para a bolsa (processo nº 2008/433-6).

**“NÃO SABENDO QUE
ERA IMPOSSÍVEL, ELE FOI LÁ E FEZ.”**

JEAN COCTEAU

RESUMO

CHRYSSAFIDIS, A. L. **Avaliação da infecção experimental por *Neospora caninum* em fêmeas bubalinas e bovinas, no terço inicial da gestação.** [Evaluation of experimental infection with *Neospora caninum* in bubaline and bovine females, in the first third of pregnancy]. 2012. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Neospora caninum é um protozoário parasita de grande importância em todo o mundo, sendo considerado a principal causa de abortamento bovino em algumas localidades. Enquanto a implicação deste parasita em distúrbios reprodutivos na espécie bovina seja conhecida, as informações disponíveis com a espécie bubalina são escassas. Este estudo avaliou e comparou as consequências da infecção experimental por *N. caninum* em búfalas e vacas, no estágio inicial da gestação, o de maior importância no que se refere à ocorrência de morte fetal. Protocolos de inseminação artificial em tempo fixo foram utilizados para maior controle da fecundação. Foram utilizados para inoculação dois isolados distintos, Nc-Bahia e Nc-1, possibilitando a comparação entre o isolado nacional e o isolado padrão. Todos os animais foram inoculados com 5×10^8 taquizoítos, pela via endovenosa, no 70º dia de gestação. Três búfalas e cinco vacas foram infectadas com o isolado Nc-Bahia, sendo detectado abortamento 42 dias pós-infecção (DPI) em somente uma das vacas inoculadas. Três búfalas e duas vacas foram inoculadas com o isolado Nc-1 e morte fetal foi detectada 35 DPI em todas as búfalas e vacas. Uma búfala e uma vaca permaneceram como controles negativos, sem infecção. A transmissão vertical foi verificada por semi-nested PCR nos animais infectados com Nc-Bahia e Nc-1. Diferentes graus de inflamação não-supurativa foram detectados em tecidos maternos, fetais e placentários. Todas as fêmeas inoculadas apresentaram resposta humoral frente à infecção. Embora a infecção estivesse mais disseminada pelo organismo das búfalas ($p < 0,05$), a resposta humoral foi menor ($p < 0,05$) e as lesões histológicas foram menos frequentes ($p < 0,05$), indicando haver maior adaptação entre *N. caninum* e as búfalas, em comparação com os resultados obtidos nas vacas. O isolado Nc-Bahia foi menos patogênico que o Nc-1, por causar menos abortamentos ($p < 0,05$) e menor frequência de lesões histológicas ($p < 0,05$). A patogenicidade do agente na espécie bubalina foi confirmada, consideradas as lesões encontradas na análise histopatológica e a detecção da presença do agente

por semi-nested PCR nos diversos tecidos estudados, além da positividade por imunoistoquímica em placenta e cérebro fetal bubalino. Esta é a primeira detecção de abortamento causado por *N. caninum* na espécie bubalina, em fêmeas infectadas experimentalmente com o protozoário, confirmando que problemas reprodutivos podem ser causados pelo *N. caninum* em búfalas.

Palavras-chave: *Neospora caninum*. Búfala. Vaca. Abortamento. Isolados.

ABSTRACT

CHRYSSAFIDIS, A. L. **Evaluation of experimental infection with *Neospora caninum* in bubaline and bovine females, in the first third of pregnancy.** [Avaliação da infecção experimental por *Neospora caninum* em fêmeas bubalinas e bovinas, no terço inicial da gestação]. 2012. 127f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Neospora caninum is a protozoan parasite with big importance all over the world, being considered the main cause of bovine abortion in some locations. While the implication of this parasite in bovine reproductive disorders is known, the available information within the buffalo species is scarce. This study evaluated and compared the consequences of experimental infection with *N. caninum* in buffaloes and cows on the initial stage of pregnancy, the most important regarding to the occurrence of fetal death. Protocols for fixed-time artificial insemination were used for greater control of fertilization. Two different isolates, Nc-Bahia and Nc-1, were utilized for inoculation, allowing the comparison between the national isolate and the standard isolate. All animals were inoculated with 5×10^8 tachyzoites, by endovenous route, at the 70th day of pregnancy. Three buffaloes and five cows were infected with the isolate Nc-Bahia and abortion was detected 42 days post-infection (DPI) in only one inoculated cow. Three buffaloes and two cows were inoculated with the isolate Nc-1 and fetal death was detected 35 DPI in all buffaloes and cows. A buffalo and a cow remained as negative controls, without infection. Vertical transmission was verified by semi-nested PCR in animals infected with Nc-Bahia and Nc-1. Different degrees of nonsuppurative inflammation were detected in maternal, foetal and placental tissues. All inoculated females showed humoral response against the infection. Although the infection was more disseminated within the body of buffaloes ($p < 0.05$), the humoral response was lower ($p < 0.05$) and histological lesions were less frequent ($p < 0.05$), indicating bigger adaptation between *N. caninum* and the buffaloes, in comparison with the results obtained in cows. Nc-Bahia isolate was less pathogenic than the Nc-1, as it caused less abortions ($p < 0.05$) and lower frequency of histological lesions ($p < 0.05$). The pathogenicity of the agent in the bubaline species was confirmed, considering the lesions found on histopathology analysis and the detection of the agent's presence by semi-nested PCR in the different studied tissues, in addition to the positivity by immunohistochemistry test in bubaline placenta and foetal brain. This

is the first detection of abortion caused by *N. caninum* in buffalo species, in females experimentally infected with the protozoan, confirming that reproductive disorders can be caused by *N. caninum* in buffaloes.

Keywords: *Neospora caninum*. Buffalo. Cow. Abortion. Isolates.

LISTA DE CRONOGRAMAS

Cronograma 1 – Protocolo de sincronização estral utilizado nas búfalas (“Ov Synch”)	46
Cronograma 2 – Protocolo de sincronização estral utilizado nas vacas	46
Cronograma 3 – Abortamentos detectados nos grupos infectados com os diferentes inóculos durante período experimental (IATF=Inseminação artificial em tempo fixo; D.M.F.=Detecção de morte fetal; P.I.=Dias pós-infecção; A.=Abate; D.G.=Dias de gestação).....	61

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Monitoramento sorológico por ELISA indireto das búfalas infectadas por *N. caninum*. Grupo 1: búfalas B1, B2 e B3 inoculadas com a cepa Nc-Bahia; grupo 3: búfalas B4, B5 e B6 inoculadas com a cepa Nc-1 e búfala negativa BN não inoculada (P.C.=ponto de corte).....62
- Gráfico 2 – Monitoramento sorológico por ELISA indireto das vacas infectadas por *N. caninum*. Grupo 2: vacas V1, V2, V3, V4 e V5 inoculadas com a cepa Nc-Bahia; e grupo 4: vacas V6 e V7 inoculadas com a cepa Nc-1 e vaca negativa VN não inoculada (P.C.=ponto de corte).....63
- Gráfico 3 – Monitoramento sorológico por ELISA indireto das fêmeas de ambas as espécies que foram inoculadas com a cepa Nc-Bahia. Grupo 1: búfalas B1, B2 e B3 e grupo 2: vacas V1, V2, V3, V4 e V5. (P.C.=ponto de corte)63
- Gráfico 4 – Monitoramento sorológico por ELISA indireto das fêmeas de ambas as espécies que foram inoculadas com a cepa Nc-1. Grupo 3: búfalas B4, B5 e B6 e grupo 4: vacas V6 e V7. (P.C.=ponto de corte).....64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Cerca eletrificada que delimita o perímetro do espaço destinado ao experimento	41
Figura 2 –	Cocho para alimentação e suplementação dos animais	41
Figura 3 –	Bebedouros reforçados construídos nos piquetes	42
Figura 4 –	Silos de superfície, fonte exclusiva de volumoso para os animais deste estudo.....	42
Figura 5 –	Búfalas selecionadas para o estudo	44
Figura 6 –	Vacas selecionadas para o estudo	45
Figura 7 –	Reações de imunoistoquímica desenvolvidas em câmaras para imunocoloração Shandon Coverplate® (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA)	57
Figura 8 –	Placenta de búfala (B1) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , sem alterações consideradas significativas.....	70
Figura 9 –	Placenta de vaca (V4) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , sem alterações consideradas significativas.....	71
Figura 10 –	Placenta de vaca (V2) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , com infiltração linfocitária moderada em carúncula materna (setas).....	72
Figura 11 –	Placenta de vaca (V3) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , exibindo necrose difusa grave	73
Figura 12 –	Placenta de búfala (B5) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , com área necrótica (seta) envolta por extensa fibrose.....	74

Figura 13 – Placenta de vaca (V7) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , exibindo extensa área de fibrose com infiltração linfocitária (setas).....	75
Figura 14 – Miométrio de búfala (B3) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , exibindo extensa área de fibrose com infiltração linfocitária (setas)	76
Figura 15 – Mucosa endometrial de vaca (V3) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , exibindo espessamento de endométrio com infiltração linfocitária (seta grande) e necrose em mucosa endometrial (setas pequenas)	77
Figura 16 – Cérebro de búfala (B1) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , exibindo gliose perivascular (seta grande) e satelitose (setas pequenas)	79
Figura 17 – Cérebro de feto bovino (FV4) infectado experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , demonstrando foco de gliose (setas)	80
Figura 18 – Cérebro de feto bubalino (FB4) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando focos de necrose com gliose (setas)	81
Figura 19 – Cérebro de feto bovino (FV6) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando foco de necrose com gliose e infiltração linfocitária perivascular (setas)	82
Figura 20 – Fígado de feto bubalino (FB4) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando congestão centrolobular e vacuolização em hepatócitos (setas).....	85
Figura 21 – Fígado de feto bovino (FB4) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando foco hemorrágico (seta)	86
Figura 22 – Coração de feto bubalino (FB2) infectado experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , demonstrando infiltração linfocitária leve em epicárdio (setas)	88
Figura 23 – Coração de feto bubalino (FB5) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando infiltração linfocitária (setas grandes) e macrofágica (seta pequena) em miocárdio	90

Figura 24 – Tecido muscular de vaca (V7) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando infiltração macrofágica intersticial leve.....	92
Figura 25 – Rim de feto bovino (FV6) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando congestão intra-glomerular (setas)	94
Figura 26 – Pulmão de feto bubalino (FB6) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando pequenos focos hemorrágicos (setas grandes) e infiltração macrofágica peribronquiolar leve (seta pequena).....	96
Figura 27 – Cérebro de feto bubalino (FB3) infectado experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , demonstrando positividade na Imunoistoquímica	99
Figura 28 – Placenta de búfala (B5) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>N. caninum</i> , demonstrando positividade na Imunoistoquímica	100
Figura 29 – Endométrio de vaca (V3) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>N. caninum</i> , demonstrando positividade na Imunoistoquímica	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estudos sorológicos com <i>N. caninum</i> em búfalos d'água (<i>B. bubalis</i>) em diferentes partes do mundo (*Teste de aglutinação direta; **Reação de Imunofluorescência Indireta; *** <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).....	38
Quadro 2 – Delineamento experimental utilizado para a inoculação das fêmeas bubalinas e bovinas no 70º dia gestacional.....	48
Quadro 3 – Descrição dos primers utilizados na análise molecular das amostras obtidas de animais infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> segundo Bazler et al. (1999)	54
Quadro 4 – Resultados encontrados na PCR realizada com DNA extraído de tecidos de animais infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> e nos animais controle não infectados (V=vaca, FV=feto bovino. B=búfala, FB=feto bubalino, n=negativo, P=positivo, *=abortamento ou morte fetal).....	67
Quadro 5 – Análise histológica realizada na placenta das búfalas e vacas inoculadas experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca;*=morte fetal)	70
Quadro 6 – Análise histológica realizada na placenta das búfalas e vacas inoculadas experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca;*=ocorrência de abortamento)	73
Quadro 7 – Análise histológica realizada no cérebro das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal).....	78
Quadro 8 – Análise histológica realizada no cérebro das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)	81
Quadro 9 – Análise histológica realizada no fígado das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)	83

Quadro 10 – Análise histológica realizada no fígado das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *=ocorrência de abortamento ou morte fetal).....	84
Quadro 11 – Análise histológica realizada no coração das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal).....	87
Quadro 12 – Análise histológica realizada no coração das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)	89
Quadro 13 – Análise histológica realizada em músculo esquelético das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal).....	91
Quadro 14 – Análise histológica realizada em músculo esquelético das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal).....	92
Quadro 15 – Análise histológica realizada no rim das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> (B=búfala; V=vaca; F=feto; *=ocorrência de abortamento ou morte fetal).....	93
Quadro 16 – Análise histológica realizada no pulmão dos fetos bovinos e bubalinos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia e o Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> (FB=feto bubalino; FV=feto bovino; *= morte fetal)	95
Quadro 17 – Resultados da imunoistoquímica desenvolvida com tecidos obtidos de búfalas, vacas e respectivos fetos infectados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia e Nc-1 de <i>N. caninum</i> (V=vaca, FV=feto bovino. B=búfala, FB=feto bubalino, *=abortamento ou morte fetal).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Abortamentos encontrados em fêmeas bubalinas e bovinas inoculadas experimentalmente com as cepas Nc-Bahia e Nc-1 de <i>N. caninum</i> (Abort.=abortamento; Gest.=gestações; %=frequência)	61
Tabela 2 – Monitoramento sorológico por RIFI das fêmeas inoculadas com a cepa Nc-Bahia. Grupo 1: búfalas B1, B2 e B3 e grupo 2: vacas V1, V2, V3, V4 e V5. (DPI=dias pós-infecção)	64
Tabela 3 – Monitoramento sorológico por RIFI das fêmeas inoculadas com a cepa Nc-1 e os animais não inoculados. Grupo 3: búfalas B9, B10 e B14, grupo 4: vacas V12, V13 e animais controle, sem infecção: BN e VN. (DPI=dias pós-infecção)	65
Tabela 4 – Resultados encontrados nas reações semi-nested PCR realizadas com DNA extraído de tecidos das fêmeas bubalinas infectadas experimentalmente com <i>N. caninum</i> e seus respectivos fetos (*morte fetal)	68
Tabela 5 – Resultados encontrados na semi-nested PCR realizada com DNA extraído de tecidos das fêmeas bovinas infectadas experimentalmente e seus respectivos fetos (*morte fetal)	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	O AGENTE ETIOLÓGICO	26
2.2	A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	27
2.3	RELAÇÃO PARASITA HOSPEDEIRO	28
2.4	LESÕES HISTOPATOLÓGICAS	32
2.5	INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	34
2.6	ISOLADOS.....	35
2.7	NEOSPOROSE EM BUBALINOS.....	36
3	MATERIAS E MÉTODOS.....	39
3.1	INSTALAÇÕES E ALIMENTAÇÃO.....	39
3.2	ANIMAIS	43
3.2.1	Búfalas	43
3.2.2	Vacas	44
3.3	MANEJO REPRODUTIVO.....	45
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	47
3.5	INÓCULOS	48
3.6	VIABILIDADE FETAL.....	49
3.7	ABATE	49
3.8	COLETA DE MATERIAIS	50

3.9. SOROLOGIA.....	51
3.10 MÉTODOS MOLECULARES.....	53
3.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	55
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4 RESULTADOS	60
4.1 ABORTAMENTOS.....	60
4.2 RESPOSTA HUMORAL	61
4.3 INVESTIGAÇÃO MOLECULAR.....	66
4.4 HISTOPATOLOGIA	69
4.4.1 Hematoxilina Eosina	69
4.4.2 Imunoistoquímica.....	97
5 DISCUSSÃO.....	102
6 CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo apicomplexa, que foi identificado pela primeira vez e descrito como um novo gênero e espécie na década de 1980, sendo até então confundido com *Toxoplasma gondii* (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984; DUBEY et al., 1988a). Este parasita está distribuído por todo o mundo e sua grande importância deve-se à capacidade de causar distúrbios reprodutivos em bovinos, sendo considerado a principal causa de abortamento em algumas localidades (DUBEY; LINDSAY, 1996). Com menor frequência, também causa doença neurológica em bovinos e canídeos (DUBEY et al., 1988a).

Em estudo com amostras de soro bovino provenientes de seis diferentes estados brasileiros, foi estabelecida soroprevalência média de *N. caninum* de 23,6% (RAGOZO et al., 2003), existindo no país diversos relatos de abortamento em vacas relacionados à neosporose. No município de Avaré, interior do estado de São Paulo, de 44 vacas com histórico de abortamento, 32 (72,7%) apresentaram títulos sorológicos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) superiores a 160 (SARTOR et al., 2003). No Paraná, Santos et al. (2005) detectaram, por imunoistoquímica, o agente em oito (23,5%) de 34 fetos abortados. No Rio Grande do Sul, 18 (81,8%) de 22 fetos abortados, com lesões histopatológicas sugestivas de protozoose, foram positivos à imunoistoquímica para *N. caninum* (CORBELLINI et al., 2002). Ainda, 10 (31,2%) de 32 amostras de cérebro de fetos bovinos abortados de diferentes localidades do país foram positivos para *N. caninum* à PCR (PAULA et al., 2004). Em contrapartida, estudos realizados em propriedades brasileiras de criação bubalina, demonstraram alta soroprevalência (de 56,0 a 70,9%) nos

INTRODUÇÃO

rebanhos estudados, sem, entretanto, terem sido comprovados abortamentos devido à neosporose (FUJII et al., 2001; SOUZA et al., 2001; GENNARI et al., 2005).

A importância do búfalo d'água (*Bubalus bubalis*) no crescimento sócio-econômico de países em desenvolvimento já foi relatada, devido à qualidade da carne e do leite, pela resistência física peculiar à espécie e melhor conversão alimentar, mesmo com forragens pobres (KHAN; NIAMATULLAH, 2010). Suryanto, Arifin e Riano (2002) enfatizaram o maior retorno econômico gerado pela bubalinocultura em relação à bovinocultura, sugerindo que o governo da Indonésia deveria apresentar estímulo financeiro aos criadores de búfalos, a fim de acelerar o crescimento econômico rural do país. Nanda e Akao (2003) relataram a grande importância da espécie bubalina para a agricultura asiática também pela docilidade e pelo potencial de tração limpa, além das características já citadas.

O Brasil detém o maior rebanho bubalino das Américas, disseminado por todo o território brasileiro, especialmente na região Norte (IBGE, 2009). O número de búfalos no país aumenta 12,7% ao ano (SILVA et al., 2003) enquanto o de bovinos cresce apenas 1,5% anualmente (IBGE, 2009).

Sabendo-se da importância da espécie bubalina à economia rural, do grande desenvolvimento da bubalinocultura no Brasil, do impacto causado à pecuária de bovinos por *N. caninum* e da alta ocorrência de búfalos soropositivos em diversas localidades, os objetivos deste trabalho foram:

- Verificar se existe abortamento causado por *N. caninum* na espécie bubalina,
- Avaliar as consequências da infecção experimental por *N. caninum* em búfalas e vacas, no estágio inicial da gestação (primeiro terço),
- Estudar as lesões causadas pelo agente em tecidos maternos, fetais e placentários, bem como verificar a presença do parasito nestas amostras,

INTRODUÇÃO

- Na ausência de abortamentos, verificar a ocorrência de transmissão vertical,
- Comparar os achados nas búfalas com vacas igualmente infectadas e
- Comparar a patogênese causada pelos diferentes isolados de *N. caninum* utilizados na infecção experimental, Nc-Bahia e Nc-1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Serão revistas e apresentadas informações fundamentais ao entendimento das atividades desenvolvidas no estudo aqui apresentado.

2.1 O AGENTE ETIOLÓGICO

Neospora caninum apresenta três formas evolutivas distintas: taquizoítos, de rápida multiplicação, presentes na fase aguda da infecção; bradizoítos, de multiplicação lenta, encontrados na fase crônica, formando cistos nos tecidos dos animais infectados; e os oocistos, formas extremamente resistentes que contaminam o ambiente, eliminados pelas fezes dos hospedeiros definitivos (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002; NETO et al., 2011).

Somente no período final da década de 1990 e início de 2000 o ciclo deste parasita foi elucidado. O cão (*Canis lupus familiaris*) foi apontado como hospedeiro definitivo, eliminando as formas de resistência no ambiente, os oocistos, após ingestão de tecidos de camundongos experimentalmente infectados, e estas estruturas foram utilizadas para infectar camundongos negativos, causando infecção (MCALLISTER et al., 1998). Posteriormente verificou-se a infecção do cão por ingestão de tecidos de bovinos positivos (DE MAREZ et al., 1999; DIJKSTRA et al., 2001; GONDIM; GAO; MCALLISTER, 2002). Atualmente, sabe-se que outros

membros da família Canidae também são hospedeiros definitivos, como os coiotes (*Canis latrans*), dingos australianos (*Canis lupus dingo*) e lobos cinzentos (*Canis lupus lupus*) (GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011). O DNA do parasita também foi encontrado em fezes de raposa européia (*Vulpes vulpes*), mas nenhum oocisto viável foi obtido (CONSTANTIN et al., 2011).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O sucesso reprodutivo dos rebanhos bovinos é fundamental ao sucesso da pecuária, sendo o abortamento causado pela neosporose um grande problema econômico. Davison et al. (1999) relataram que 12,5% de todos os abortamentos ocorridos em gado leiteiro na Grã-Bretanha foram causados por *N. caninum*. Innes et al. (2005), também na Grã-Bretanha, observaram que vacas soropositivas têm de três a sete vezes maior chance de abortar que vacas soronegativas, enquanto González-Warleta et al. (2011), na Espanha, encontraram *odds ratio* de 9,1 com a mesma análise.

Em recente compilação de dados da Nova Zelândia e Estados Unidos, estimou-se perda econômica anual ao redor de um bilhão de dólares devido à neosporose naqueles países e na Australásia, região formada por Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné e pequenas ilhas vizinhas. Nesta região, onde a brucelose foi erradicada, *N. caninum* está implicado em 30 a 40% dos abortamentos diagnosticados em gado bovino (REICHEL, 2011). Estes gastos são empregados

em diagnóstico e tratamento veterinário, reposição de animais positivos e possível queda na produção.

Na região espanhola da Galícia, foi detectada redução de produção leiteira em rebanhos onde a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* superou os 20%, com perda média de 1,6kg de leite por vaca (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2011), enquanto nos Estados Unidos houve estimativa de perda de US\$ 128.00 por cada vaca soropositiva em lactação (DUBEY, 1999). No Brasil estas perdas ainda não foram mensuradas.

De acordo com Buxton, McAllister e Dubey (2002), o gado bovino apresenta maior suscetibilidade ao *N. caninum* em comparação a outras espécies ruminantes, entretanto, os autores se referiam especialmente a pequenos ruminantes. A ocorrência da infecção natural por *N. caninum* nos ovinos e caprinos é bastante baixa. Em infecções experimentais em ovinos foi demonstrada a transmissão vertical com lesões similares às observadas nos bovinos. Embora não tenha sido demonstrada a transmissão vertical em gestações consecutivas, observou-se que a gravidade das lesões dependia da fase gestacional em que ocorria a infecção (BUXTON et al., 1998).

2.3 RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

A espécie bovina é a mais acometida pela infecção por *N. caninum*, tendo como principais consequências as perdas na esfera reprodutiva. A infecção de uma fêmea gestante e suscetível pode causar três diferentes desfechos: abortamento,

com presença ou ausência de expulsão fetal; a gestação pode ser concluída, mas o filhote nasce com sintomatologia clínica; ou pode haver o nascimento de um filhote saudável, porém infectado (INNES et al., 2002).

O herbívoro pode adquirir o agente de duas maneiras: horizontalmente, ingerindo oocistos presentes no ambiente, ou verticalmente, pela via transplacentária. É significativamente alta a relação entre soropositividade materna e de bezerros recém-nascidos avaliados em período pré-colostral, ressaltando a importância da infecção transplacentária para a transmissão da neosporose na espécie bovina (CARDOSO et al., 2012). A transmissão vertical foi vista inicialmente em cães, sendo posteriormente demonstrada em bovinos (DUBEY; LINDSAY, 1989; DUBEY et al., 1992). Também foi verificada a transmissão congênita de *N. caninum* em ovinos, caprinos e suínos (DUBEY; LINDSAY, 1996; JENSEN et al., 1998; KOBAYASHI et al., 2001).

Embora a infecção pelo *N. caninum* aparentemente seja controlada com eficiência pelo sistema imunológico do hospedeiro, sendo os casos em sua grande maioria assintomáticos, não há o estabelecimento da memória imune eficaz após a infecção. As vacas positivas, mesmo as que já apresentaram abortamento, podem voltar a abortar devido à neosporose. Sendo assim, concluiu-se que a transmissão transplacentária pode ocorrer repetidas vezes no mesmo animal e, desta maneira, *N. caninum* pode permanecer circulando por sucessivas gerações no mesmo rebanho, sem a participação do hospedeiro definitivo (THURMOND; HIETALA, 1997; INNES et al., 2002).

Nos casos em que fêmeas infectadas apresentam abortamentos sucessivos, duas situações específicas podem ter sido estabelecidas: a reinfecção endógena, se houve a reativação dos cistos teciduais de bradizoítos formados na infecção anterior;

ou a reinfecção exógena, quando o animal volta a ingerir oocistos dispersados no ambiente pelos hospedeiros definitivos (TREES; WILLIAMS, 2005).

Durante a gestação ocorre uma série de alterações hormonais e metabólicas, dentre elas a modulação do sistema imunológico da mãe. Neste período ocorre uma supressão da resposta imune do tipo Th1, com características inflamatórias, ligada à imunidade celular, com o objetivo de evitar a rejeição do feto pela resposta imune materna e permitir o seu pleno desenvolvimento. Esta resposta imune do tipo Th1 é fundamental para o combate a parasitas intracelulares, como *N. caninum*, uma vez que, dentro das células, estes não estão mais vulneráveis à resposta humoral, caracterizada como Th2. A menor capacidade de ativação da resposta de defesa celular durante a gestação é a oportunidade que favorece a reativação da infecção, permitindo a transmissão do agente pela via transplacentária (INNES et al., 2001; INNES et al., 2002; QUINN; ELLIS; SMITH, 2002).

A variabilidade dos desfechos da doença está ligada a uma série de fatores, como a fase da gestação em que a transmissão vertical ocorre, o que muitas vezes está associado ao momento em que ocorre a reativação da infecção crônica nas vacas (WILLIAMS et al., 2003). Também são fatores fundamentais o estágio de desenvolvimento e a capacidade de resposta imunológica do feto (BUXTON et al., 1998), a carga parasitária e as características de patogenicidade do isolado de *N.caninum* (INNES et al., 2002) além da suscetibilidade da espécie do hospedeiro (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002).

O monitoramento da produção de anticorpos durante a gestação de vacas positivas foi utilizado como uma forma indireta de avaliar o recrudesimento da infecção. Assim, observou-se que em vacas que apresentaram aumento de anticorpos específicos na segunda metade da gestação, houve geração de bezerros

cl clinicamente sadios, porém infectados. Já em vacas que apresentaram aumento de anticorpos na primeira metade da gestação, houve abortamento (GUY et al., 2001). Em condições experimentais, observou-se que o período da gestação em que a infecção foi induzida foi determinante para a sobrevivência do feto (WILLIAMS et al., 2003).

O primeiro terço da gestação é o período de maior vulnerabilidade do feto, pois o timo, o baço e os linfonodos periféricos ainda estão em formação (OSBURN, 1986). Na ausência da resposta imune por parte do feto, o parasito se reproduz livremente causando lesões intensas em diversos órgãos, levando à morte fetal que ocorre em média 24 dias pós-infecção (DPI). A indução de resposta imune materna contra o parasito e as lesões inflamatórias na interface materno-fetal acabam inviabilizando a sobrevivência do feto e a manutenção da gestação (INNES et al., 2005; WILLIAMS et al., 2000; WILLIAMS; TREES, 2006).

A partir do terço médio da gestação o feto já possui a capacidade de reconhecimento de microrganismos e o desenvolvimento de uma resposta imune rudimentar (OSBURN, 1986). Em vacas infectadas neste período gestacional, foi possível detectar alterações na expressão de citocinas no baço (ALMERIA et al., 2003), produção de interferon gama e linfoproliferação específica de amostras de linfonodos dos fetos (BARTLEY et al., 2004). Esta resposta, entretanto, é ainda insuficiente para uma adequada proteção contra o agente, visto que nesta fase é observada a maior quantidade de abortamentos em condições naturais (DUBEY; LINDSAY, 1996).

As lesões nos fetos infectados em terço médio da gestação são menos intensas que aquelas observadas nos fetos infectados em fases mais precoces, com a mesma dose infectante (INNES et al., 2005; MACALDOWIE et al., 2004). As

principais alterações se concentram na interface materno-fetal, sugerindo uma capacidade parcial de controle da infecção. Além da própria presença do parasito, pequenas áreas de inflamação e necrose no sistema nervoso central do feto indicam a transmissão vertical (MALEY et al., 2003). Estas lesões não necessariamente causam a morte do feto, causando, contudo, o nascimento de bezerros apresentando sequelas neurológicas (INNES, et al., 2002).

No terço final da gestação, a capacidade de resposta contra o patógeno cresce progressivamente, aumentando as chances de sobrevivência do feto. Nesta fase, também existe a possibilidade da não ocorrência da transmissão vertical. São maiores as chances do nascimento de bezerros saudáveis, podendo estar infectados ou não (OSBURN, 1986; WILLIAMS et al., 2000; BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002).

2.4 LESÕES HISTOPATOLÓGICAS

A infecção por *N. caninum* pode causar lesões em sistema nervoso central e periférico, olhos, músculo esquelético, coração, pele, fígado, rins e pulmões, com grau de inflamação variando de médio a grave. Nas espécies já estudadas, a resposta celular predominante é a linfocítica, com presença de histiócitos. Pode haver meningite, acompanhada ou não de encefalite. Deve-se suspeitar de neosporose sempre que forem encontradas lesões não-supurativas em cérebro, meninges, coração ou músculos esqueléticos. É indício considerável de neosporose a visualização de necrose multifocal em cérebro de bovinos jovens ou produtos de

abortamento desta espécie. Reações de imunoistoquímica (IHQ) são indicadas para pesquisa de taquizoítos nas lesões estudadas (MCALLISTER, 2005).

Embora possa infectar diversos tecidos, *N. caninum* possui predileção pelo sistema nervoso central, onde o agente se localiza inicialmente ao redor dos vasos. Em fetos jovens pode haver a destruição do neurópilo (tecido entre os corpos celulares neuronais), possivelmente com pouca reação inflamatória. Já em fetos mais velhos, que são capazes de formar uma resposta imune ao agente, a multiplicação é mais restrita e a necrose é confinada a focos de intensa reação inflamatória, envolvendo microglia, astrócitos reativos e células linfóides, podendo haver meningite (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002). Pescador et al. (2005) apontaram o cérebro como sendo o órgão de eleição para realização de teste de IHQ, embora também tenham sido encontradas lesões sugestivas de infecção por protozoário em músculo esquelético, coração e pulmões.

Destruição celular e reações inflamatórias linfocitárias também podem estar presentes em coração, músculo esquelético, pulmão e fígado fetais (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002). Um feto natimorto, concebido por uma vaca naturalmente infectada, apresentou severas lesões cardíacas (ADRIANARIVO et al., 2005).

Oito (23,5%) de 34 fetos abortados, provenientes de fazendas leiteiras do estado do Paraná, foram positivos ao *N. caninum* na IHQ, sendo encontradas lesões inflamatórias não supurativas em cérebro e coração, além de gliose e necrose multifocal no córtex cerebral (SANTOS et al., 2005).

Análise histológica de placentônios, realizada após infecção experimental por *N. caninum* em vacas prenhes, demonstrou focos de necrose nas vilosidades fetais, com aglomerações de taquizoítos no mesênquima da região afetada, havendo ainda

uma considerável reação inflamatória no septo caruncular materno, com debris celulares necróticos e presença de exsudato seroso em interstício (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; MACALDOWIE et al., 2004).

Macaldowie et al. (2004) observaram maior mortalidade fetal e lesões mais severas em placenta quando a inoculação do agente foi realizada pela via endovenosa (EV), comparando-se com a inoculação via subcutânea (SC), ambas no 70º dia de gestação.

2.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Em infecções experimentais observou-se que existe variação de resposta em relação às diferentes vias de inoculação e à dose infectante. Oito (100%) de oito vacas soronegativas inoculadas via EV no início da gestação (70º dia) apresentaram morte fetal, enquanto seis (75%) de oito vacas soronegativas inoculadas via SC, também no 70º dia de gestação, apresentaram o mesmo quadro (MACALDOWIE et al., 2004). A injeção de taquizoítos pela via EV produziu lesões inflamatórias e necróticas intensas na placenta fetal e materna e morte fetal ao 28º DPI. Com a injeção pela via SC, a mortalidade fetal foi de 50% (MALEY et al., 2006). No que se refere à dose infectante, quanto maior a carga infectante, menor o tempo para o aparecimento das lesões e maior a intensidade das mesmas (MALEY et al., 2003).

Seis búfalas experimentalmente infectadas com 5×10^6 taquizoítos do isolado Nc-Illinois pela via SC, apresentaram pico sorológico, determinado por RIFI, três

semanas pós-infecção, sugerindo ser este o período de maior atividade e multiplicação do parasita (RODRIGUES et al., 2005).

Dois grupos de vacas prenhes inoculadas com 10^7 taquizoítos de *N. caninum* no 70º dia gestacional, pela via EV, foram acompanhadas por 45 dias. Cinco vacas foram infectadas com o isolado Nc-Spain e cinco com o isolado Nc-1, sendo detectado abortamento no 26º e no 35º DPI, em somente três das cinco vacas do segundo grupo (ROJO-MONTEJO et al., 2009).

2.6 ISOLADOS

Existem inúmeros isolados atualmente no mundo, obtidos das mais diversas espécies. O isolado Nc-Bahia (GONDIM et al., 2001) foi obtido de uma cadela adulta que apresentou incoordenação motora e paralisia de membros posteriores, tendo sido atendida em uma clínica veterinária particular na cidade de Salvador. O médico veterinário suspeitou de degeneração medular e iniciou tratamento com corticóides, solicitando a RIFI anti-*N. caninum* paralelamente. Ao detectar positividade (título 1600), o tratamento foi alterado para antibioticoterapia, mas o animal não resistiu e veio a óbito duas semanas mais tarde.

Líquido cefalorraquidiano deste cão foi coletado post-mortem e testado por RIFI, apresentando título de 100. Cistos teciduais foram visualizados no cérebro da cadela e apresentaram forte marcação à imunoistoquímica. Posteriormente, fragmentos do órgão foram processados e inoculados em gerbilos. Cinco de nove roedores infectados desenvolveram sintomatologia clínica. Fragmentos de cérebro

dos gerbilos infectados foram então inoculados em cultivo celular (linhagem COS-1) e taquizoítos foram detectados em todas as garrafas inoculadas. Os taquizoítos obtidos foram testados por PCR, confirmando a presença de *N. caninum*. As passagens posteriores foram realizadas em linhagem celular COS-1 e VERO.

O Nc-1 (DUBEY et al., 1988b) é considerado o isolado padrão por ter sido o primeiro isolamento relatado. Toda uma ninhada de cães apresentou paralisia espástica de membros posteriores 5-6 semanas após o nascimento. Dos sete filhotes, seis desenvolveram doença grave, sendo que três deles foram eutanasiados e estudados. Todos os filhotes foram positivos à RIFI. Diferentes tecidos foram obtidos, processados e inoculados em garrafas de cultivo celular com linhagens de monócitos ou células de endotélio arterial cardiopulmonar, ambas de bovinos. Houve visualização de taquizoítos em garrafas inoculadas com tecidos de dois destes filhotes e posteriormente estes parasitas foram utilizados para inocular outros cães negativos, gerando sorologia positiva. Para diferenciação dos parasitas, houve tentativa de isolamento de *T. gondii*, inoculando-se os tecidos obtidos em camundongos, entretanto não houve positividade.

2.7 NEOSPOROSE EM BUBALINOS

Búfalas soropositivas para neosporose e seus respectivos bezerros foram acompanhados sorologicamente por um ano, desde o momento do parto. Amostras de sangue de 29 búfalas prenhes foram coletadas e testadas por RIFI, sendo que 23 (79,3%) mostraram-se positivas ao *N. caninum* e 17 bezerros (73,9%) dos 23

apresentaram anticorpos contra o agente na fase pré-colostral, fato sugestivo de transmissão congênita (RODRIGUES et al., 2005).

Diversos grupos estudaram a infecção por *N. caninum* em búfalos, apontando variados níveis de soroprevalência, como demonstrados no Quadro 1. A variabilidade dos valores provavelmente ocorre devida a falta de padronização dos testes, pontos de corte utilizados e seleção dos animais. Sabe-se que, quanto maior a idade dos animais, maior será a soroprevalência (EIRAS et al., 2011).

Nesses estudos realizados com bubalinos, foi demonstrado que os animais têm contato frequente com o parasita, sugerindo que o agente está circulando ativamente nos rebanhos. Ainda assim, relatos de problemas reprodutivos e abortamentos devido a *N. caninum* são inexistentes, mesmo em criações com relativo grau de tecnificação, onde os animais são manejados e visualizados com frequência.

No Brasil, foi isolado *N. caninum* proveniente de búfalas adultas positivas à RIFI, na diluição de 1:100, por bioensaio em cães alimentados com cérebro desses animais naturalmente infectados e por inoculação em gerbilos (RODRIGUES et al., 2004), indicando a viabilidade do agente nessa espécie.

Recentemente, na Argentina, dez búfalas prenhes por monta natural, soronegativas para neosporose (título na RIFI<100) foram divididas em quatro grupos e inoculadas com 10^8 taquizoítos de *N. caninum* (isolado Nc-1) por via EV ao 70º dia de gestação (n=3) e ao 90º dia gestacional (n=7). Os animais inoculados no 70º dia foram abatidos em 28 dias pós-infecção (DPI), três animais inoculados no 90º dia foram abatidos 28 DPI e os animais restantes, inoculados no 90º, dia foram abatidos aos 42 DPI. Todas as búfalas soroconverteram uma semana após a inoculação e permaneceram com títulos até o abate. Não foi detectado abortamento

REVISÃO DE LITERATURA

e um dos fetos obtidos ao abate foi considerado inviável, estando de tamanho menor que os outros fetos estudados. O DNA do parasita foi detectado por nPCR em 8 das 10 placentas obtidas e em 9 de 10 fetos obtidos (KONRAD et al., 2012). Este estudo forneceu evidências de infecção vertical na espécie bubalina.

Quadro 1 – Estudos sorológicos com *N. caninum* em búfalos d'água (*B. bubalis*) em diferentes partes do mundo (*Teste de aglutinação direta; **Reação de Imunofluorescência Indireta; ****Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Autor	Local	Positivos (%)	Ponto de corte	Técnica
Dubey et al. (1998)	Egito	68,0	1:20	DAT*
Huong et al. (1998)	Vietnã	1,5	1:640	RIFI** e ELISA***
Gondim et al.(1999 a/b)	Brasil (BA)	36,5	1:200	RIFI
Guarino et al. (2000)	Itália	34,6	1:200	RIFI
Souza et al. (2001)	Brasil (SP)	56,0	1:200	RIFI
Fujii et al. (2001)	Brasil (SP)	63,9	1:25	RIFI
Gennari et al. (2005)	Brasil (PA)	70,9	1:25	RIFI
Vogel et al. (2006)	Brasil (RS)	14,6	-	ELISA
Yu et al. (2007)	China	0	-	ELISA
Campero et al. (2007)	Argentina	64,0	1:100	RIFI
Hajikolaei et al. (2007)	Irã	37,0	-	ELISA
Konnai et al. (2008)	Filipinas	3,8	-	ELISA
Nasir et al. (2011)	Paquistão	54,7	-	ELISA

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos entre maio de 2008 e fevereiro de 2011, sendo as atividades laboratoriais desenvolvidas paralelamente e extendidas até dezembro de 2011.

3.1 INSTALAÇÕES E ALIMENTAÇÃO

Nas instalações do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) no Câmpus Administrativo de Pirassununga (CAPS) da Universidade de São Paulo (USP), foi selecionada uma área que não era ocupada por animais há pelo menos cinco anos, diminuindo assim o risco de contaminação ambiental por quaisquer agentes patogênicos. Nessa área foi construída uma cerca eletrificada de cinco fios (Figura 1), três eletrificados e dois neutros, com 335 metros de perímetro na área designada à manutenção dos animais e uma cerca divisória central de 87 metros, fechando uma área total de aproximadamente um hectare, formando dois piquetes, um para as búfalas e um para as vacas. Da maneira que a cerca foi disposta, animais de qualquer tamanho eram impossibilitados de entrar ou sair do espaço experimental, aplicando-se aí os princípios da biosseguridade e evitando-se quaisquer variáveis indesejáveis ao estudo, como a entrada de cães ou outros canídeos no pasto. A divisória central possuía apenas três fios, dada a

MATERIAL E MÉTODOS

impossibilidade de fuga e o condicionamento dos animais, que passaram a evitar qualquer proximidade com a cerca.

Cada piquete contou com um módulo de cocho (Figura 2) para silagem, ração e sal mineralizado, formados por cinco metades de galões plásticos de 200 litros fixados em uma estrutura de madeira. Dados os relatos de problemas com quebras de bebedouros por búfalos, foi feita a opção por bebedouros em alvenaria (Figura 3), com abertura limitada e elevada do chão, impedindo que os animais conseguissem enfiar as patas na água, e com bóia coberta por tampa de concreto, evitando quebras. Estas diretrizes garantiram a oferta *ad libitum* de água limpa para os animais. Foram mantidas as árvores do local, proporcionando sombreamento adequado.

Dois silos de superfície foram confeccionados, contendo um total aproximado de 270 toneladas de silagem de milho (Figura 4). Também foram produzidas 22,5 toneladas de ração para vacas gestantes. A alimentação era fornecida de acordo com as especificações gerais para grandes ruminantes gestantes – 25kg de volumoso e 2kg de ração por dia por animal, com sal mineralizado e água à vontade – evitando-se restrição alimentar, que poderia comprometer o ciclo reprodutivo das fêmeas (BARUSELLI; CARVALHO, 2006). A ração foi produzida na fábrica de ração do Câmpus Administrativo da USP em Pirassununga e o sal adquirido em empresa comercial especializada.

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1 – Cerca eletrificada que delimita o perímetro do espaço destinado ao experimento

Figura 2 – Cocho para alimentação e suplementação dos animais

Figura 3 – Bebedouros reforçados construídos nos piquetes

Figura 4 – Silos de superfície, fonte exclusiva de volumoso para os animais deste estudo

3.2 ANIMAIS

Foram utilizadas búfalas e vacas selecionadas e adquiridas no Estado de São Paulo, nos anos de 2008 e 2009, todas de propriedades rurais sem histórico de surtos de abortamentos.

3.2.1 Búfalas

Foram visitadas diversas propriedades de criação bubalina (*Bubalus bubalis*) do estado de São Paulo, sendo coletadas no total 192 amostras de soro de búfalas em idade reprodutiva (24 a 48 meses de idade), para a pesquisa de anticorpos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a fim de seleção dos animais soronegativos ao *N. caninum*. Somente 23 amostras (12%) foram negativas (12 em Registro, dez em Eldorado e uma em São Carlos). Foi ainda realizada sorologia para *Toxoplasma gondii* nesses animais selecionados, sendo nove animais excluídos por serem soropositivos (oito de Registro e um de Eldorado). Portanto, foram escolhidas as oito búfalas da propriedade de Eldorado (Figura 5), da raça murreh, por estarem em idade reprodutiva, ciclando, não prenhes, pesando de 370 kg a 440 kg, sendo uma nulípara, três primíparas e quatro múltíparas, todas negativas para os dois coccídios e outros agentes abortivos (brucelose e leptospirose) e de interesse sanitário (tuberculose).

Figura 5 – Búfalas selecionadas para o estudo

3.2.2 Vacas

Foram visitadas quatro propriedades da região de Pirassununga e coletadas 48 amostras de soro de vacas em idade reprodutiva (24 a 48 meses). Destas, 29 (60,42%) foram soronegativas para anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI. Foram então realizados exames para outras doenças de importância para a esfera reprodutiva (toxoplasmose, brucelose, leptospirose) e de interesse sanitário (tuberculose). Oito vacas negativas para todas as enfermidades testadas foram selecionadas (Figura 6) e adquiridas de duas propriedades, formando um grupo

MATERIAL E MÉTODOS

homogêneo de vacas de cruzamentos entre zebuínos e taurinos, pesando de 340kg a 390kg cada, sendo duas nulíparas, quatro primíparas e duas múltiparas.

Figura 6 – Vacas selecionadas para o estudo

3.3 MANEJO REPRODUTIVO

Com a colaboração do Departamento de Reprodução Animal (VRA – FMVZ – USP), foi realizada a sincronização estral de todos os animais do projeto, búfalas e vacas, para posterior inseminação artificial em tempo fixo (IATF), possibilitando rigoroso controle do dia e período gestacional.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os protocolos indicados nos Cronogramas 1 e 2 para sincronização de cio das búfalas e das vacas (BARUSELLI e MADUREIRA, 2000):

Cronograma 1 – Protocolo de sincronização estral utilizado nas búfalas (“Ov Synch”)

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

PG – Prostaglandina sintética

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

Cronograma 2 – Protocolo de sincronização estral utilizado nas vacas

P4 – Progestágeno

BE – Benzoato de estradiol

PG – Prostaglandina sintética

eCG – Gonadotrofina coriônica equina

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

Os produtos utilizados foram: GnRH Sincroforte® (Ourofino, Brasil); PG Sincrocio® (Ourofino, Brasil); dispositivo intravaginal de P4 Primer® (Tecnopec, Brasil); BE Sincrodiol® (Ourofino, Brasil); eCG Folligon® (Intervet, Brasil). As doses de sêmen de ambas as espécies foram adquiridas de empresa Cofa Brasil®, sendo as doses bovinas provenientes de touros da raça holandesa e as doses bubalinas da

raça mediterrânea. Todas as doses foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido, à temperatura de aproximadamente -196°C, até o momento do uso.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram sendo formados de acordo com o sucesso obtido no manejo reprodutivo. Foram, portanto, formados quatro grupos experimentais distintos de fêmeas em início da gestação: o grupo 1, composto por três búfalas (B1, B2 e B3); o grupo 2, composto por cinco vacas (V1 a V5); o grupo 3, composto por três búfalas (B4, B5 e B6); e o grupo 4, composto por duas vacas (V6 e V7).

Uma búfala (BN) e uma vaca (VN) que não apresentaram sucesso reprodutivo permaneceram não-inoculadas, atuando como controles negativos e controles ambientais, sendo animais sentinelas para qualquer eventual contaminação. Ao final dos experimentos, forneceram materiais para comparação com amostras obtidas das fêmeas infectadas.

Uma das búfalas foi descartada do experimento devido a graves problemas apresentados no casco (laminite), necessitando tratamento, o que poderia interferir nos resultados do estudo.

Os animais deste estudo foram inoculados experimentalmente de acordo com o delineamento ilustrado no Quadro 2. Todos os animais foram monitorados e avaliados semanalmente até o momento do abate.

MATERIAL E MÉTODOS

Quadro 2 – Delineamento experimental utilizado para a inoculação das fêmeas bubalinas e bovinas no 70º dia gestacional

GRUPO	Nº DE ANIMAIS	ISOLADO
1	3 búfalas	Nc-Bahia
2	5 vacas	
3	3 búfalas	Nc-1
4	2 vacas	
N	1 vaca e 1 búfala	-

3.5 INÓCULOS

Foram utilizados os isolados Nc-Bahia (GONDIM et al., 2001) e Nc-1 (DUBEY et al., 1988b) para a inoculação das vacas e búfalas prenhes.

Todos os inóculos utilizados continham 5×10^8 taquizoítos por animal, produzidos em cultivo celular de células Vero, em meio RPMI enriquecido com 5% de soro fetal bovino estéril. Todas as fêmeas foram inoculadas pela via EV no septuagésimo (70º) dia gestacional.

Antes da utilização do isolado Nc-1 para infecção dos animais dos grupos 3 e 4, houve inoculação prévia em gerbilos, modelo experimental consagrado para este agente (RAMAMOORTHY; SRIRANGANATHAN; LINDSAY, 2005), para verificar a capacidade do isolado em efetivamente causar doença. Este teste foi realizado devido à possibilidade de diminuição de patogenicidade do agente, que vinha sendo mantido somente em cultivo celular por um longo período de tempo (BARTLEY et al., 2006). Para tanto, cinco gerbilos foram inoculados com 10^7 taquizoítos de *N. caninum*, da cepa Nc-1, pela via intraperitoneal. Os cinco animais apresentaram

MATERIAL E MÉTODOS

início de sintomatologia clínica no 3º DPI, mostrando-se nitidamente prostrados e doentes ao 6º DPI. Ao 7º DPI foram eutanasiados por traumatismo cervical e 10ml de meio RPMI introduzidos no espaço peritoneal, sendo recuperados 5ml de líquido por animal. Taquizoítos de *N. caninum* foram facilmente identificados ao microscópio ótico no lavado peritoneal. Após duas centrifugações a 2000Xg para lavagem, o material foi inoculado em garrafa já com tapete de células VERO para o preparo das doses infectantes.

3.6 VIABILIDADE FETAL

A viabilidade fetal era verificada por exame ultrassonográfico, realizada por técnico em reprodução animal do VRA. Foi realizado acompanhamento semanal, de acordo com a disponibilidade de equipamento, pessoal e instalações. A morte fetal era confirmada pela ausência de batimentos cardíacos no feto.

3.7 ABATE

Todos os animais foram abatidos no frigorífico do Câmpus da USP em Pirassununga. Houve insensibilização dos animais por concussão cerebral, utilizando-se pistola de ar comprimido, previamente ao abate por sangria, quando são seccionadas a veia cava e a artéria aorta, na região cervical ventral. As

MATERIAL E MÉTODOS

carcaças de todos os animais abatidos foram descartadas e encaminhadas à graxaria, depois de realizadas as coletas de tecidos para análises. Os grupos experimentais 1 e 2 (três búfalas e cinco vacas), inoculadas com a cepa Nc-Bahia, foram abatidos no 42º dia pós-infecção (DPI). Os grupos 3 e 4 (três búfalas e duas vacas), inoculadas com a cepa Nc-1, foram abatidos no 35º dias após infecção, junto aos animais não infectados.

3.8 COLETA DE MATERIAIS

Semanalmente foram coletadas amostras de sangue de todas as fêmeas, que eram centrifugadas a 2000 x *g* por 10 minutos para a separação do soro, utilizado para monitoramento da resposta imunológica humoral. As amostras de soro foram mantidas congeladas a -20°C até o momento das análises.

Ao abate, amostras de sangue total das fêmeas e dos fetos foram obtidas por punção cardíaca e processados para a obtenção de soro como descrito anteriormente. Também foram coletados fragmentos de tecidos fetais (cérebro, coração, músculo semitendinoso, pulmão, baço, rim e fígado), maternos (cérebro, medula, coração, linfonodo, masseter, baço e fígado) e placentários (placentônios inteiros). Em algumas amostras haviam partes do útero, sendo possível a sua análise.

Os tecidos foram coletados em duplicata, sendo uma alíquota armazenada em solução de formol a 3% para análise histopatológica e a outra acondicionada em

MATERIAL E MÉTODOS

criotubo e colocada imediatamente em nitrogênio líquido, para os estudos moleculares.

3.9 SOROLOGIA

As amostras de soro foram analisadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com ponto de corte de 1:50 e por ensaio imunoenzimático indireto (ELISA).

O ELISA indireto para as duas espécies foi desenvolvido com o kit comercial *Neospora* Ab Test ® (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, EUA), sendo as amostras de soro diluídas na proporção de 1:100 e 100µl de amostra diluída pipetada em cada cavidade da placa de microtitulação com 96 cavidades, impregnada com antígenos de *N. caninum*. Cem microlitros dos controles positivo e negativo também foram pipetados na placa, ambos em duplicata e sem diluir. A incubação foi realizada por 30 minutos, em temperatura ambiente, sendo então o conteúdo descartado e cada cavidade lavada com 300µl de solução de lavagem tamponada com fosfato. Então, 100µl de anticorpo monoclonal anti-IgG de bovino conjugado com peroxidase (HRPO) foram pipetados em todas as cavidades e uma nova incubação por 30 minutos em temperatura ambiente foi realizada. O conteúdo foi descartado e as cavidades lavadas com 300µl de solução de lavagem tamponada com fosfato. Foram colocados 100µl de substrato tetrametilbenzidina (TMB) com peróxido de hidrogênio em cada cavidade e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. Após colocada 100µl de solução de bloqueio em cada

MATERIAL E MÉTODOS

cavidade, a leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro (Labsystems Ascent Multiskan #354, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA).

O cálculo do ponto de corte para este teste obedeceu a seguinte equação:

$$P.C. = [(xCP-xCN)/2]+xCN$$

Sendo: P.C. – ponto de corte; xCP – média da leitura das duas cavidades com o controle positivo; xCN – média da leitura das duas cavidades com o controle negativo.

A RIFI foi realizada utilizando-se como antígeno taquizoítos íntegros da cepa Nc-1 fixados em lâminas preparadas para a técnica. As amostras de soro para teste, bem como os controles, foram diluídas a 1:50, pipetadas nas lâminas e incubadas a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida. Após três lavagens em solução salina tamponada por 5 minutos, foi adicionada solução contendo anticorpos conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). Com os soros dos bubalinos foi utilizado conjugado anti-Ac. bubalino (CCZ-SP, São Paulo, SP, Brazil) e com os soros dos bovinos foi utilizado conjugado anti-IgG bovino (Sigma, St Louis, MO, EUA). Ambos eram diluídos na proporção de 1:3000. Após 30 minutos de incubação as lâminas foram novamente lavadas, para remoção do conjugado livre remanescente e, depois de secas, cobertas com glicerina tamponada e lamínula. A leitura dos resultados foi realizada em microscópio para imunofluorescência, com iluminação ultravioleta e consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência em toda a superfície do taquizoíto impregnado na lâmina. As amostras que apresentaram ausência de fluorescência ou fluorescência apenas em região apical foram consideradas negativas (PARÉ et al., 1995). Em todas as lâminas de RIFI estavam presentes um soro controle positivo e um soro controle negativo da espécie testada.

MATERIAL E MÉTODOS

Para titulação, as amostras positivas na diluição inicial de 1:50 foram sequencialmente diluídas em base 2 até diluição máxima em que a positividade foi observada.

3.10 MÉTODOS MOLECULARES

Foi realizada a extração de DNA das amostras de placenta (ou útero, nos controles negativos), coração (materno e fetal), cérebro (materno e fetal) e pulmão (fetal), com o DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo-se o protocolo:

- Fragmentos dos tecidos (até 80 mg) foram colocados em microtubos de 1,5 ml e adicionados 180µL de tampão de lise de tecidos (buffer ATL) e 20µL de proteinase K.
- Agitou-se cada microtubo contendo a mistura em vortex por 15 segundos.
- Para a lise dos tecidos foi realizada incubação em Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 56°C, programado para 1200rpm por 1 minuto, a cada 10 minutos, em tempo total de 6 horas. Caso a amostra não estivesse completamente lisada, o mesmo ciclo era repetido.
- Novamente as amostras foram agitadas em vortex por 15 segundos.
- Foram adicionados 200 µL de tampão de lise (buffer AL) à cada amostra, que foram posteriormente agitadas em vortex por alguns segundos.
- Adicionados 200 µL de etanol absoluto (96-100%) e nova agitação em vortex por 15 segundos.
- A mistura toda era então pipetada em uma coluna de centrifugação Dneasy® Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha) e alojada em um tubo de coleta de 2 ml.

MATERIAL E MÉTODOS

- Centrifugou-se a 6000Xg (8000 rpm) por 1 minuto, sendo descartados o material filtrado e o tubo coletor.
- A coluna foi colocada em novo tubo coletor de 2 ml e foram adicionados 500µl de tampão de lavagem com guanidina (buffer AW1). Centrifugou-se por 1 minuto a 6000Xg e o material filtrado e o tubo coletor foram descartados.
- A coluna foi colocada em novo tubo coletor de 2 ml e foram adicionados 500µl de tampão de lavagem alcoólico (buffer AW2). Centrifugou-se por 5 minutos a 12400Xg (14000rpm) e o filtrado e o tubo coletor foram descartados.
- A coluna era então colocada em um microtubo identificado de 1,5ml. Foram adicionados 100µl de solução 10mM Tris-Cl 0.5mM EDTA (buffer AE) para a eluição do DNA e deixou-se as amostras incubando por 1 minuto em temperatura ambiente. Centrifugou-se as amostras por 1 minuto em 6000Xg e repetiu-se esta última etapa para máxima obtenção de DNA.

A análise molecular por semi-nested PCR foi feita de acordo com protocolo descrito por Baszler et al. (1999), com alvo no gene pNC-5, específico de *N. caninum*, utilizando-se consecutivamente os pares de primers Np4-Np7 e Np6-Np7 (Quadro 3).

Quadro 3 – Descrição dos primers utilizados na análise molecular das amostras obtidas de animais infectados experimentalmente com *N. caninum* segundo Bazler et al. (1999)

Primer	Sequência
Np4	5'CCTCCCAATGCGAACGAAA3'
Np6	5'CAGTCAACCTACGTCTTCT3'
Np7	5'GGGTGAACCGAGGGAGTTG3'

O par de primers Np4-Np7 amplifica um fragmento de DNA de 275 pb, que serve de base para o par de primers Np6-Np7, gerando um fragmento de DNA de 227 pb. A utilização dos primers Np6-Np7 otimiza os resultados obtidos com os primers anteriores, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste.

O mix de 50 µl utilizado com ambos os primers era o mesmo, contendo 150 ng de DNA alvo, 2 mM MgCl₂, 10x tampão de reação (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,3], 0,1% Triton X-100), 10 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP e 2U de Taq DNA polimerase. Os procedimentos foram realizadas em termociclador (Mastercycler® personal, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) programado para 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 60 segundos.

3.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Todas as amostras de tecidos obtidas foram fixadas em formalina tamponada a 3% e permaneceram nesta solução por 24 horas, passando para etanol 70% por um período máximo de sete dias. A seguir, fragmentos selecionados destes tecidos foram cortados, acondicionados em cassetes plásticos e passaram por um processo automatizado de desidratação com álcool e clarificação por xilol (TP1020®, Leica, Wetzlar, Alemanha). Depois de secos, os cassetes foram preenchidos com parafina, para posterior microtomia e análises de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises histopatológicas foram desenvolvidas com grupo colaborador, no *Protozoology Laboratory – Parasitic Diseases Department* do *Moredun Research Institute* (MRI), em Edimburgo, na Escócia.

Todos os tecidos coletados e emblocados foram analisados histologicamente. Para tanto, a coloração por hematoxilina-eosina (HE) foi realizada em máquina automatizada (Shandon Varistain 24-4®, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), utilizando-se 22 compartimentos de acordo com a seguinte programação:

- 3 minutos em xileno.
- 3 minutos em xileno.
- 2 minutos em álcool absoluto.
- 2 minutos em álcool absoluto.
- 30 segundos em álcool absoluto / água (1:1).
- 90 segundos em água comum.
- 5 minutos em hematoxilina (coloração dos núcleos).
- 150 segundos em água corrente.
- 1 segundo em solução HCl 1% em álcool 70%, para remover coloração de fundo indesejável.
- 1 minuto em água comum.
- 1 minuto em água destilada.
- 2 minutos em água comum.
- 90 segundos em eosina (coloração de fundo).
- 150 segundos em água comum.
- 1 minuto em álcool 70%.
- 45 segundos em álcool 95%.
- 90 segundos em álcool absoluto.
- 90 segundos em álcool absoluto.
- 2 minutos em álcool absoluto.
- 2 minutos xileno.
- 2 minutos xileno.

MATERIAL E MÉTODOS

- Compartimento final de xileno, onde as lâminas ficam até o momento da montagem.

A montagem das lâminas, com líquido fixador (DPX) e cobertura por lamínula, para posterior leitura em microscópio óptico simples, também foi realizada em aparelho automatizado (Shandon Consul Automated Coverslipper®, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA).

Para a confirmação da presença do parasita por imunohistoquímica (IHC) foram usados os tecidos de maior importância: o cérebro dos fetos e os placentônios. Foi utilizado o EnVision®+Kit HRP Rabbit (Dako, Albertslund, Dinamarca) para as reações, tendo como anticorpo primário o anti-*N. caninum* policlonal de coelho. Foram empregadas câmaras para imunocoloração Shandon Coverplate® (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), demonstradas na Figura 7.

Figura 7 – Reações de imunohistoquímica desenvolvidas em câmaras para imunocoloração Shandon Coverplate® (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA)

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o seguinte protocolo para as reações de imunistoquímica (IHC) nos tecidos estudados:

- Inicialmente fazer a desparafinização das seções
 - Xileno 5 minutos
 - Xileno 5 minutos
 - Etanol 100% 5 minutos
- Retirar as lâminas do etanol e colocá-las em solução H_2O_2 3% em metanol durante 30 minutos em temperatura ambiente (TA)
- Retirar as lâminas da solução de metanol e colocá-las em tampão 50mM tris 150mM NaCl (TBS)
- Secar a área ao redor de cada seção e preencher a superfície com TBS
- Encaixar a lâmina em uma câmara de IHC
- Preencher imediatamente o reservatório com TBS
- Permitir a drenagem do TBS, verificando a velocidade correta para assegurar o perfeito encaixe
- Adicionar 100 μl de solução de bloqueio (25 μl de soro normal caprino e 75 μl de TBS) em cada câmara e incubar em temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos
- Lavar as lâminas com TBS duas vezes
- Adicionar 100 μl da solução de anticorpo primário (1:4000) em cada câmara e incubar a 4°C (geladeira) overnight
- Lavar as lâminas com TBS duas vezes
- Adicionar 100 μl de soro secundário marcado com polímero (conjugado) em cada câmara e incubar em temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos
- Lavar as lâminas com TBS duas vezes
- Adicionar 100 μl de substrato cromógeno em cada câmara e incubar em temperatura ambiente por pelo menos 7min30seg
- Lavar as lâminas com TBS duas vezes
- Proceder a montagem na Shandon Consul Automated Coverslipper® (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA)

A leitura dos resultados foi realizada em microscópio óptico comum. Todas as leituras foram realizadas com o auxílio de técnicos especialistas em patologia. Placentas bovinas e cérebros fetais bovinos negativos para *N. caninum* foram gentilmente fornecidas pelo *Moredun Research Institute*.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização das análises estatísticas, foram utilizados os softwares Minitab Statistical (Minitab Inc., State College, PA, EUA), Excel 12.0 (Microsoft, Redmond, WA, EUA) e SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, EUA).

Foi utilizado o teste T para duas amostras para as variáveis quantitativas de distribuição normal, como os resultados obtidos na sorologia por RIFI e ELISA indireto.

Os resultados da frequência de abortamento, das análises moleculares, da análise histopatológica e da imunoistoquímica foram categorizados (negativo=0, positivo=1) e, por não terem apresentado distribuição normal, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney.

Para análise da concordância entre as técnicas utilizadas para monitoramento sorológico, os resultados também foram categorizados e foi aplicado o coeficiente Kappa para cada dia de inoculação.

Em todos os testes considerou-se diferença significativa (rejeitou-se H_0) quando valor de p obtido foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

Foram observados resultados positivos em todas as análises realizadas, corroborando com os resultados de trabalhos de outros autores e somando novas conclusões ao conhecimento do tema abordado.

4.1 ABORTAMENTOS

Nos grupos 1 e 2, infectados com o isolado Nc-Bahia, a morte fetal foi detectada aos 42 DPI, em apenas uma das vacas (V3). Todas as fêmeas foram abatidas para possibilitar melhor visualização das lesões e também por estarem saindo do terço inicial da gestação, foco principal do estudo, já que se encontravam no 112º dia gestacional. No 35º DPI, foi detectada morte fetal em todos os animais infectados com o isolado Nc-1, pertencentes aos grupos 3 e 4, sendo procedido o abate imediato, de acordo com o Cronograma 3.

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as espécies infectadas, em relação à ocorrência de abortamentos. Todavia, houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à ocorrência de abortamentos causados pelos diferentes isolados utilizados, com maior ocorrência nas fêmeas infectadas com o isolado Nc-1.

RESULTADOS

Cronograma 3 – Abortamentos detectados nos grupos infectados com os diferentes inóculos durante período experimental (IATF=Inseminação artificial em tempo fixo; D.M.F.=Detecção de morte fetal; P.I.=Dias pós-infecção; A.=Abate; D.G.=Dias de gestação)

IATF	Inoculação Dia 0	D.M.F. Nc-1 Dia 35	D.M.F. Nc-Bahia Dia 42	P.I.
↓ 0	↓ 70	↓ A. 105	↓ A. 112	D.G.

A relação entre as fêmeas gestantes e as que abortaram, inoculadas com os isolados Nc-Bahia ou Nc-1, está expressa na Tabela 1.

Tabela 1 – Abortamentos encontrados em fêmeas bubalinas e bovinas inoculadas experimentalmente com as cepas Nc-Bahia e Nc-1 de *N. caninum* (Abort.=abortamento; Gest.=gestações; %=frequência)

Espécie Animal	Nc-Bahia			Nc-1		
	Abort.	Gest.	%	Abort.	Gest.	%
Búfalas	0	3	0	3	3	100
Vacas	1	5	20	2	2	100
Total	1	8	12,5	5	5	100

4.2 RESPOSTA HUMORAL

Houve soroconversão em todos os animais inoculados com as duas cepas de *N. caninum* à partir do 14º DPI. Os animais não inoculados (controles negativos)

RESULTADOS

permaneceram negativos durante todo o estudo. Anticorpos anti-*N. caninum* não foram detectados nas amostras de soro de nenhum dos fetos estudados.

Os resultados obtidos por ELISA indireto serão apresentados agrupados por espécie estudada e por inóculo utilizado nos Gráficos 1 a 4. Os resultados da RIFI estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3.

Gráfico 1 – Monitoramento sorológico por ELISA indireto das búfalas infectadas por *N. caninum*. Grupo 1: búfalas B1, B2 e B3 inoculadas com a cepa Nc-Bahia; grupo 3: búfalas B4, B5 e B6 inoculadas com a cepa Nc-1 e búfala negativa BN não inoculada (P.C.=ponto de corte)

RESULTADOS

Gráfico 2 – Monitoramento sorológico por ELISA indireto das vacas infectadas por *N. caninum*. Grupo 2: vacas V1, V2, V3, V4 e V5 inoculadas com a cepa Nc-Bahia; e grupo 4: vacas V6 e V7 inoculadas com a cepa Nc-1 e vaca negativa VN não inoculada (P.C.=ponto de corte)

Gráfico 3 – Monitoramento sorológico por ELISA indireto das fêmeas de ambas as espécies que foram inoculadas com a cepa Nc-Bahia. Grupo 1: búfalas B1, B2 e B3 e grupo 2: vacas V1, V2, V3, V4 e V5. (P.C.=ponto de corte)

RESULTADOS

Gráfico 4 – Monitoramento sorológico por ELISA indireto das fêmeas de ambas as espécies que foram inoculadas com a cepa Nc-1. Grupo 3: búfalas B4, B5 e B6 e grupo 4: vacas V6 e V7. (P.C.=ponto de corte)

Tabela 2 – Monitoramento sorológico por RIFI das fêmeas inoculadas com a cepa Nc-Bahia. Grupo 1: búfalas B1, B2 e B3 e grupo 2: vacas V1, V2, V3, V4 e V5. (DPI=dias pós-infecção)

DPI	B1	B2	B3	V1	V2	V3	V4	V5
0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	800	0	0	0	0	0	0	0
14	3200	800	3200	0	1600	0	0	100
21	3200	1600	200	3200	400	800	50	800
28	800	0	200	3200	800	100	3200	400
35	1600	400	200	400	1600	400	100	1600
42	100	200	100	800	800	800	200	3200

RESULTADOS

Tabela 3 – Monitoramento sorológico por RIFI das fêmeas inoculadas com a cepa Nc-1 e os animais não inoculados. Grupo 3: búfalas B4, B5 e B6, grupo 4: vacas V6, V7 e animais controle, sem infecção: BN e VN. (DPI=dias pós-infecção)

DPI	B4	B5	B6	V6	V7	BN	VN
0	0	0	0	0	0	0	0
7	100	3200	100	0	0	0	0
14	1600	0	100	1600	1600	0	0
21	0	800	0	1600	1600	0	0
28	50	800	800	400	1600	0	0
35	0	100	100	800	100	0	0

Analisando-se os resultados obtidos com o ELISA indireto, a produção de IgG anti-*N. caninum* na resposta imunológica humoral das búfalas foi menor que a encontrada nas vacas infectadas com ambos os isolados. Houve diferença significativa entre as respostas imunes detectadas nas búfalas e nas vacas em 7 DPI ($p<0,01$), 21 DPI ($p<0,05$), 28 DPI ($p<0,01$), 35 DPI ($p<0,01$) e 42 DPI ($p<0,05$). Somente em 14 DPI não foi detectada diferença significativa.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando foram comparados os resultados do ELISA indireto encontrados na mesma espécie hospedeira quando infectada pelos diferentes isolados.

Na RIFI, comparando-se os resultados obtidos entre as espécies infectadas com ambos os isolados, houve diferença significativa ($p<0,05$) em 7 DPI, com maior resposta nas búfalas e em 42 DPI, com maior resposta nas vacas. Não houve diferença ($p>0,05$) entre as respostas encontradas entre os indivíduos da mesma espécie infectados com diferentes isolados.

RESULTADOS

Houve boa concordância entre os testes sorológicos utilizados, quando comparados os resultados qualitativos nos diferentes DPI ($0,66 \leq \text{Kappa} \leq 1,00$).

4.3 INVESTIGAÇÃO MOLECULAR

Os resultados da semi-nested PCR para o gene Nc5 (BASZLER et al., 1999) encontram-se no Quadro 4 e os resultados organizados por espécie estão demonstrados nas Tabelas 3 e 4.

Foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$) entre a frequência da positividade detectada nos tecidos das fêmeas bubalinas e bovinas analisados por semi-nested PCR. Houve maior positividade nos tecidos das búfalas analisadas, indicando que o parasita estaria mais disseminado naqueles animais. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) quando considerados os resultados obtidos com a análise dos tecidos provenientes da mesma espécie de hospedeiro infectada com isolados diferentes.

RESULTADOS

Quadro 4 – Resultados encontrados na PCR realizada com DNA extraído de tecidos de animais infectados experimentalmente com *N. caninum* e nos animais controle não infectados (V=vaca, FV=feto bovino. B=búfala, FB=feto bubalino, n=negativo, P=positivo, *=abortamento ou morte fetal)

Isolado	Grupo	Animal	Tecido			
			Cérebro	Coração	Placenta	Pulmão
NcBahia	Grupo 1	B1	P	P	P	
		FB1	P	n		P
		B2	P	P	P	
		FB2	P	P		P
		B3	P	P	P	
		FB3	P	P		P
	Grupo 2	V1	n	n	n	
		FV1	n	P		n
		V2	n	n	n	
		FV2	n	P		P
		V3*	n	P	P	
		FV3*	P	P		P
		V4	P	n	P	
		FV4	n	n		n
		V5	n	n	n	
		FV5	n	n		P
Nc1	Grupo 3	B4*	P	n	P	
		FB4*	P	n		n
		B5*	P	P	P	
		FB5*	n	P		P
		B6*	P	P	P	
		FB6*	P	P		P
	Grupo 4	V6*	n	n	P	
		FV6*	n	P		P
		V7*	n	n	P	
		FV7*	P	P		P
-	Controle	BN	n	n	n	n
		VN	n	n	n	n

RESULTADOS

Tabela 4 – Resultados encontrados nas reações semi-nested PCR realizadas com DNA extraído de tecidos das fêmeas bubalinas infectadas experimentalmente com diferentes isolados de *N. caninum* e seus respectivos fetos (+=positivo, - =negativo, *=morte fetal)

Inóculo	Mãe/feto	Cérebro	Coração	Placenta	Pulmão
		Mãe/feto	Mãe/feto	Mãe	Feto
Nc-Bahia	B1/FB1	+/+	+/-	+	+
	B2/FB2	+/+	+/+	+	+
	B3/FB3	+/+	+/+	+	+
Nc-1	B4/FB4*	+/+	-/-	+	-
	B5/FB5*	+/-	+/+	+	+
	B6/FB6*	+/+	+/+	+	+
Ctrl. neg.	BN	-	-	-	-

Tabela 5 – Resultados encontrados na semi-nested PCR realizada com DNA extraído de tecidos das fêmeas bovinas infectadas experimentalmente com diferentes isolados de *N. caninum* e seus respectivos fetos (+=positivo, - =negativo, *=morte fetal)

Inóculo	Mãe/feto	Cérebro	Coração	Placenta	Pulmão
		Mãe/feto	Mãe/feto	Mãe	Feto
Nc-Bahia	V1/FV1	-/-	-/+	-	-
	V2/FV2	-/-	-/+	-	+
	V3/FV3*	-/+	+/+	+	+
	V4/FV4	+/-	-/-	+	-
	V5/FV5	-/-	-/-	-	+
Nc-1	V6/FV6*	-/-	-/+	+	+
	V7/FV7*	-/+	-/+	+	+
Ctrl. neg.	VN	-	-	-	-

4.4 HISTOPATOLOGIA

As análises histopatológicas dos tecidos coletados ao abate e corados por HE, assim como os testes de IHC realizados em placenta e cérebros fetais foram desenvolvidas no *Moredun Research Institute* e estão apresentados neste capítulo.

4.4.1 Hematoxilina Eosina

Não foram detectadas quaisquer alterações nas placentas das búfalas infectadas experimentalmente com o isolado Nc-Bahia, sendo encontradas lesões somente nas búfalas infectadas com Nc-1. Foram detectadas lesões ns vacas infectadas com ambos os isolados.

As alterações encontradas nas placentas dos animais infectados com os isolados Nc-Bahia e Nc-1 estão demonstrados nos Quadros 5 e 6. As lesões encontradas estão exemplificadas nas Figuras 8 a 13.

RESULTADOS

Quadro 5 – Análise histológica realizada na placenta das búfalas e vacas inoculadas experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; *=morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-Bahia	B1	Nenhuma
	B2	Nenhuma
	B3	Nenhuma
	V1	Escassos vilos fetais necróticos, infiltração macrofágica leve em carúncula materna
	V2	Infiltração linfocitária moderada em carúncula materna
	V3*	Necrose difusa grave, infiltração linfocitária moderada em carúncula materna
	V4	Nenhuma
	V5	Nenhuma

Figura 8 – Placenta de búfala (B1) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, sem alterações consideradas significativas

RESULTADOS

Figura 9 – Placenta de vaca (V4) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, sem alterações consideradas significativas

RESULTADOS

Figura 10 – Placenta de vaca (V2) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, com infiltração linfocitária moderada em carúncula materna (setas)

RESULTADOS

Figura 11 – Placenta de vaca (V3) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, exibindo necrose difusa grave

Quadro 6 – Análise histológica realizada na placenta das búfalas e vacas inoculadas experimentalmente com o isolado Nc-1 de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; *=ocorrência de abortamento)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-1	B4*	Necrose multifocal, infiltração linfocitária leve perivascular, fibrose
	B5*	Necrose multifocal, infiltração linfocitária leve perivascular, fibrose
	B6*	Infiltração macrofágica e linfoplasmocitária difusa na base da carúncula materna, necrose difusa, fibrose
	V6*	Infiltração linfoplasmocitária em carúncula materna e tecido conjuntivo, fibrose, necrose multifocal
	V7*	Necrose multifocal, infiltração linfoplasmocitária e macrofágica difusa na base da carúncula materna, fibrose

RESULTADOS

Figura 12 – Placenta de búfala (B5) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, com área necrótica (seta) envolta por extensa fibrose

RESULTADOS

Figura 13 – Placenta de vaca (V7) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, exibindo extensa área de fibrose com infiltração linfocitária (setas)

Foi visualizada infiltração linfoplasmocitária e macrofágica no miométrio uterino da búfala B3 (Figura 14), inoculada com o isolado Nc-Bahia. Esta alteração também foi visualizada nos úteros das vacas V2 e V3, infectadas com este mesmo isolado. Somente na vaca V3, a única infectada com Nc-Bahia e que apresentou abortamento, houve também necrose multifocal em mucosa endometrial (Figura 15).

RESULTADOS

Figura 14 – Miométrio de búfala (B3) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, exibindo extensa área de fibrose com infiltração linfocitária (setas)

RESULTADOS

Figura 15 – Mucosa endometrial de vaca (V3) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, exibindo espessamento de endométrio com infiltração linfocitária (seta grande) e necrose em mucosa endometrial (setas pequenas)

RESULTADOS

Os resultados observados nos cérebros das fêmeas adultas e fetos inoculados com Nc-Bahia e Nc-1 estão apresentados nos Quadros 7 e 8, sendo exemplificados pelas Figuras 16 a 19.

Quadro 7 – Análise histológica realizada no cérebro das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-Bahia	B1	Pequeno foco de gliose perivascular, pequeno foco de satelitose
	FB1	Sem material
	B2	Nenhuma
	FB2	Nenhuma
	B3	Gliose perivascular leve
	FB3	Pequeno foco de gliose
	V1	Nenhuma
	FV1	Sem material
	V2	Degeneração neuronal focal com satelitose
	FV2	Nenhuma
	V3*	Nenhuma
	FV3*	Autólise avançada
	V4	Nenhuma
	FV4	Gliose multifocal
	V5	Nenhuma
	FV5	Área escurecida com gliose, gliose perivascular

RESULTADOS

Figura 16 – Cérebro de búfala (B1) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, exibindo gliose perivascular (seta grande) e satelitose (setas pequenas)

RESULTADOS

Figura 17 – Cérebro de feto bovino (FV4) infectado experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, demonstrando foco de gliose (setas)

RESULTADOS

Quadro 8 – Análise histológica realizada no cérebro das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-1	B4*	Sateliteose multifocal
	FB4*	Necrose e gliose multifocais
	B5*	Nenhuma
	FB5*	Necrose e gliose multifocais
	B6*	Sateliteose leve, infiltração macrofágica leve perivascular, infiltração linfocitária leve em meninges
	FB6*	Pequeno foco de necrose com gliose
	V6*	Nenhuma
	FV6*	Gliose multifocal, necrose multifocal, infiltração linfocítica moderada perivascular
	V7*	Sateliteose e gliose multifocais
	FV7*	Gliose multifocal

Figura 18 – Cérebro de feto bubalino (FB4) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando focos de necrose com gliose (setas)

RESULTADOS

Figura 19 – Cérebro de feto bovino (FV6) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando foco de necrose com gliose e infiltração linfocitária perivascular (setas)

RESULTADOS

Os resultados observados nos fígados das fêmeas adultas e fetos inoculados com Nc-Bahia e Nc-1 estão apresentados nos Quadros 9 e 10, sendo exemplificados pelas Figuras 20 e 21.

Quadro 9 – Análise histológica realizada no fígado das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-Bahia	B1	Infiltração linfocitária periportal leve com alguns macrófagos, infiltração linfocitária leve em cápsula
	FB1	Nenhuma
	B2	Pequeno foco de infiltração linfocitária perivascular, pequenos focos de infiltração linfocitária periportal
	FB2	Congestão moderada, vacuolização moderada
	B3	Infiltração linfocitária e macrofágica leve periportal
	FB3	Nenhuma
	V1	Nenhuma
	FV1	Nenhuma
	V2	Focos de infiltração macrofágica e linfocitária periportal, necrose focal com infiltração linfocitária centro-lobular
	FV2	Nenhuma
	V3*	Infiltração linfocitária e macrofágica leve em espaço periportal, congestão, pequena infiltração neutrofílica centro-lobular
	FV3*	Autólise avançada
	V4	Nenhuma
	FV4	Nenhuma
	V5	Pequeno foco de infiltração linfocitária perivascular
	FV5	Nenhuma

RESULTADOS

Quadro 10 – Análise histológica realizada no fígado das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *=ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-1	B4*	Infiltração periportal leve linfocítica, infiltração linfocitária e macrofágica pericanalicular
	FB4*	Vacuolização intensa em hepatócitos, congestão centro-lobular
	B5*	Nenhuma
	FB5*	Nenhuma
	B6*	Congestão difusa, infiltração linfocitária e macrofágica periportal, fibrose periportal com infiltração eosinofílica, linfocitária e macrofágica centro-lobular, necrose e hemorragia multifocais
	FB6*	Hemorragia, infiltração linfocitária e macrofágica leve periportal
	V6*	Pequenos focos de necrose com infiltração linfocitária leve periportal, congestão focal
	FV6*	Vacuolização, congestão, infiltração macrofágica perivascular, hemorragia multifocal
	V7*	Congestão disseminada, infiltração linfocitária leve periportal
	FV7*	Congestão, hemorragia multifocal, infiltração macrofágica moderada multifocal

RESULTADOS

Figura 20 – Fígado de feto bubalino (FB4) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando congestão centro-lobular e vacuolização em hepatócitos (setas)

RESULTADOS

Figura 21 – Fígado de feto bovino (FB4) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando foco hemorrágico (seta)

RESULTADOS

Os resultados observados nos corações das fêmeas adultas e fetos inoculados com ambos os isolados estão apresentados nos Quadros 11 e 12. As alterações encontradas estão exemplificadas pelas Figuras 22 e 23.

Quadro 11 – Análise histológica realizada no coração das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-Bahia	B1	Infiltração linfocitária leve em epicárdio
	FB1	Infiltração linfocitária leve em epicárdio
	B2	Infiltração linfocitária leve em epicárdio
	FB2	Infiltração linfocitária leve em epicárdio
	B3	Nenhuma
	FB3	Infiltração linfocitária leve em epicárdio
	V1	Infiltração linfocitária leve em tecido conjuntivo
	FV1	Infiltração linfocitária leve perivascular, infiltração linfocitária leve em epicárdio
	V2	Infiltração linfocitária leve entre as fibras musculares
	FV2	Infiltração linfocitária e macrofágica leve perivascular em miocárdio
	V3*	Infiltração linfocitária perivascular leve
	FV3*	Infiltração linfocitária e macrofágica moderada em epicárdio, autólise
	V4	Nenhuma
	FV4	Nenhuma
	V5	Infiltração linfoplasmocitária e macrófaga perivascular, infiltração macrofágica intersticial
	FV5	Infiltração linfocitária em endocárdio, infiltração linfocitária leve perivascular

RESULTADOS

Figura 22 – Coração de feto bubalino (FB2) infectado experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, demonstrando infiltração linfocitária leve em epicárdio (setas)

RESULTADOS

Quadro 12 – Análise histológica realizada no coração das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-1	B4*	Infiltração macrofágica perivascular
	FB4*	Infiltração linfocitária e macrofágica no epicárdio, infiltração macrofágica perivascular
	B5*	Infiltração macrofágica leve perivascular, fibras musculares necróticas com infiltração macrofágica
	FB5*	Infiltração linfocitária e macrofágica em pericárdio e miocárdio
	B6*	Infiltração linfocitária leve perivascular, pequeno foco hemorrágico
	FB6*	Infiltração linfocitária leve em epicárdio, infiltração macrofágica leve perivascular
	V6*	Infiltração linfocitária e macrofágica leve perivascular
	FV6*	Infiltração linfocitária e macrofágica leve em epicárdio, infiltração linfocitária leve em endocárdio
	V7*	Infiltração linfocitária leve em epicárdio
	FV7*	Infiltração macrofágica leve perivascular, infiltração macrofágica leve em epicárdio

RESULTADOS

Figura 23 – Coração de feto bubalino (FB5) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando infiltração linfocitária (setas grandes) e macrofágica (seta pequena) em miocárdio

RESULTADOS

Os resultados observados em tecido muscular das fêmeas adultas e fetos inoculados com os isolados Nc-Bahia e Nc-1 estão apresentados nos Quadros 13, 14 e Figura 24.

Quadro 13 – Análise histológica realizada em músculo esquelético das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-Bahia	B1	Nenhuma
	FB1	Infiltração linfocitária perivascular leve no tecido conjuntivo
	B2	Pequeno foco de infiltração linfocitária intersticial
	FB2	Nenhuma
	B3	Nenhuma
	FB3	Infiltração linfocitária leve perivascular
	V1	Infiltração linfocitária perivascular leve
	FV1	Nenhuma
	V2	Infiltração linfocitária leve entre as fibras musculares
	FV2	Nenhuma
	V3*	Pequenos focos inflamatórios com infiltração linfocitária perivascular
	FV3*	Infiltração linfocitária e macrofágica leve intersticial, autólise
	V4	Nenhuma
	FV4	Nenhuma
	V5	Nenhuma
	FV5	Infiltração linfocitária e macrofágica leve no tecido conjuntivo

RESULTADOS

Quadro 14 – Análise histológica realizada em músculo esquelético das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *= ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-1	B4*	Nenhuma
	FB4*	Nenhuma
	B5*	Infiltração linfocitária intersticial
	FB5*	Infiltração linfocitária leve perivascular
	B6*	Infiltração linfocitária e macrofágica leve perivascular
	FB6*	Infiltração linfocitária leve em epimísio
	V6*	Focos de necrose em algumas fibras musculares com infiltração linfocitária e macrofágica
	FV6*	Infiltração linfocítica no epimísio, infiltração macrofágica nas fibras musculares
	V7*	Infiltração macrofágica leve intersticial
	FV7*	Infiltração linfocitária e macrofágica em epimísio

Figura 24 – Tecido muscular de vaca (V7) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando infiltração macrofágica intersticial leve

RESULTADOS

Não foram encontradas alterações nos rins de nenhuma vaca ou búfala adulta inoculada com o isolado Nc-Bahia e nos fetos destas fêmeas as alterações visualizadas foram raras, havendo infiltração linfocitária leve perivascular e na cápsula renal em dois fetos bubalinos (FB2 e FB3) e um feto bovino (FV5).

As alterações encontradas nos rins das fêmeas e seus respectivos fetos inoculados com o isolado Nc-1 estão demonstradas no quadro 15 e exemplificadas na Figura 25.

Quadro 15 – Análise histológica realizada no rim das búfalas e vacas e seus respectivos fetos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-1 de *Neospora caninum* (B=búfala; V=vaca; F=feto; *=ocorrência de abortamento ou morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-1	B4*	Infiltração linfocitária leve perivascular
	FB4*	Infiltração linfocitária em cápsula, foco hemorrágico em pelve renal
	B5*	Foco de infiltração macrofágica perivascular
	FB5*	Infiltração linfocitária e macrofágica leve em cápsula
	B6*	Sem material
	FB6*	Infiltração linfocitária e macrofágica na cápsula e da pelve renal
	V6*	Infiltração linfocitária e macrofágica em pelve renal, congestão
	FV6*	Hemorragia na pelve renal, infiltração linfoplasmocitária em cápsula, congestão disseminada
	V7*	Infiltração linfocitária leve perivascular, necrose focal única, infiltração macrofágica leve glomerular, congestão
	FV7*	Infiltração linfocitária e macrofágica periglomerular, congestão difusa

RESULTADOS

Figura 25 – Rim de feto bovino (FV6) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando congestão intra-glomerular (setas)

RESULTADOS

As alterações encontradas nos pulmões dos fetos bovinos infectados por ambos os isolados estão demonstrados no Quadro 16 e na Figura 27.

Quadro 16 – Análise histológica realizada no pulmão dos fetos bovinos e bubalinos inoculados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia e o Nc-1 de *Neospora caninum* (FB=feto bubalino; FV=feto bovino; *= morte fetal)

Inóculo	Animal	Alteração detectada
Nc-Bahia	FB1	Nenhuma
	FB2	Nenhuma
	FB3	Nenhuma
	FV1	Infiltração linfocitária leve no tecido conjuntivo interlobular
	FV2	Nenhuma
	FV3*	Infiltração linfoplasmocitária e macrofágica leve multifocal, autólise
	FV4	Leve infiltração linfoplasmocitária perivascular
	FV5	Infiltração macrofágica perivascular
Nc-1	FB4*	Nenhuma
	FB5*	Nenhuma
	FB6*	Infiltração linfocitária e macrofágica peribronquiolar leve, pequenos focos hemorrágicos
	FV6*	Congestão, hemorragia peribronquiolar e no tecido conjuntivo
	FV7*	Infiltração linfocitária e macrofágica intersticial difusa

RESULTADOS

Figura 26 – Pulmão de feto bubalino (FB6) infectado experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando pequenos focos hemorrágicos (setas grandes) e infiltração macrofágica peribronquiolar leve (seta pequena)

Foi detectada infiltração linfocítica e neutrofílica na polpa vermelha de baço do feto bovino FV2 e da vaca V3, ambos inoculados com o isolado Nc-Bahia. Nenhuma outra alteração foi detectada em tecido esplênico obtido dos outros animais utilizados neste estudo.

Os linfonodos retrofaríngeos, coletados de todos os animais adultos inoculados com ambos os isolados, apresentavam sinais de ativação, com grande densidade de células do sistema imune por todo o parênquima linfonodal.

Nenhuma alteração foi detectada nos tecidos obtidos dos animais controles negativos.

RESULTADOS

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a frequência das lesões detectadas nas espécies bubalina e bovina, sendo maior a ocorrência de lesões nos tecidos obtidos das fêmeas bovinas. Houve também diferença significativa ($p < 0,05$) quando considerada a mesma espécie infectada com isolados diferentes, com maior a ocorrência de lesões nas fêmeas inoculadas com Nc-1.

4.4.2 Imunoistoquímica

Os resultados obtidos nas reações de IHC desenvolvidas com as amostras de cérebro fetal e placentas estão apresentados no quadro 17. A positividade nestes tecidos é ilustrada pelas Figuras 27 e 28.

Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a frequência da positividade detectada nos tecidos das espécies bubalina e bovina. Também não houve diferença quando considerada a mesma espécie infectada com isolados diferentes.

Uma parte do endométrio uterino da vaca inoculada com a cepa Nc-Bahia e que apresentou abortamento (V3) estava incluída na lâmina submetida à IHC que continha a placenta. Neste tecido também foi visualizada positividade (Figura 29), mas este resultado não foi considerado nas análises estatísticas.

RESULTADOS

Quadro 17 – Resultados da imunoistoquímica desenvolvida com tecidos obtidos de búfalas, vacas e respectivos fetos infectados experimentalmente com o isolado Nc-Bahia e Nc-1 de *N. caninum* (V=vaca, FV=feto bovino. B=búfala, FB=feto bubalino, *=abortamento ou morte fetal)

Isolado	Grupo	Animal	Tecido	
			Placenta	Cérebro
NcBahia	Grupo 1	B1	Negativo	
		FB1		Negativo
		B2	Negativo	
		FB2		Negativo
		B3	Negativo	
		FB3		Positivo
	Grupo 2	V1	Negativo	
		FV1		Negativo
		V2	Negativo	
		FV2		Negativo
		V3*	Positivo	
		FV3*		Positivo
		V4	Negativo	
		FV4		Negativo
		V5	Negativo	
		FV5		Positivo
Nc1	Grupo 3	B4*	Negativo	
		FB4*		Negativo
		B5*	Positivo	
		FB5*		Negativo
		B6*	Negativo	
		FB6*		Negativo
	Grupo 4	V6*	Negativo	
		FV6*		Negativo
		V7	Positivo	
		FV7*		Negativo

RESULTADOS

Figura 27 – Cérebro de feto bubalino (FB3) infectado experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, demonstrando positividade na Imunoistoquímica

RESULTADOS

Figura 28 – Placenta de búfala (B5) infectada experimentalmente com o isolado Nc-1 de *N. caninum*, demonstrando positividade na Imunoistoquímica

RESULTADOS

Figura 29 – Endométrio de vaca (V3) infectada experimentalmente com o isolado Nc-Bahia de *N. caninum*, demonstrando positividade na Imunoistoquímica

5 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi analisar a patogenia da neosporose nas fêmeas bubalinas prenhes, já que havia indícios de resistência da espécie ao abortamento por *N. caninum*, dadas as altas soroprevalências detectadas nos rebanhos e a ausência de associação da doença com a ocorrência de abortamentos. Assim, o delineamento experimental utilizado neste estudo – o tamanho do inóculo (5×10^8 taquizoítos), o período gestacional para inoculação (70º dia) e a via de inoculação (EV) – foi assim determinado devido aos resultados obtidos por Macaldowie et al. (2004), que demonstraram 100% de morte fetal em vacas inoculadas com *N. caninum* utilizando semelhantes procedimentos, com o isolado Nc-1, sendo até então o único registro de abortamento em todos os animais inoculados de um mesmo grupo.

Foram montados grupos experimentais pareados, com búfalas e vacas exatamente no mesmo dia gestacional. As fêmeas bovinas atuaram como controle positivo da infecção, por ser bastante conhecida a patogenia da doença nesta espécie. Os grupos foram montados de acordo com o sucesso obtido no manejo reprodutivo. Analisando-se os protocolos de IATF realizados, os resultados gerais encontraram-se dentro do esperado de 50% de chances de sucesso. A diferença de tempo entre os experimentos realizados com os grupos inoculados com os diferentes isolados foi causada pela estacionalidade estral característica da espécie bubalina (BARUSELLI, 1993; BARUSELLI et al., 2000). Como as búfalas não permanecem em período reprodutivo o ano inteiro, houve a necessidade de aguardar a chegada dos meses de inverno para que os novos procedimentos

fossem iniciados. Duas fêmeas, uma búfala e uma vaca, que não apresentaram prenhez após quatro tentativas de inseminação permaneceram como controles negativos. Estes animais permaneceram junto aos grupos inoculados com ambos isolados e foram de fundamental importância, indicando que o espaço experimental não foi contaminado durante o desenvolvimento do projeto. Também contribuíram com tecidos para comparação na análise histopatológica.

Inicialmente foi utilizado o isolado Nc-Bahia (GONDIM et al, 2001) para a infecção experimental dos animais. Este isolado foi escolhido por ser relativamente novo e obtido no Brasil. Esperava-se que fosse apresentar alta patogenicidade, o que possibilitaria comparação mais nítida entre as espécies, pela produção de lesões e abortamentos nos animais infectados. Entretanto, os resultados encontrados nos dois primeiros grupos experimentais, especificamente em relação aos abortamentos, sugeriram baixa patogenicidade daquele isolado e os animais restantes foram infectados com a cepa Nc-1 (DUBEY et al, 1988b), considerada a cepa “padrão” de *N. caninum*, de patogenicidade conhecida e já utilizado em diversos outros estudos.

A diferença de 13 anos entre o isolamento do Nc-Bahia e do Nc-1 é relevante devido ao período que o parasita permanece somente em cultivo *in vitro*. Bartley et al. (2006) já haviam demonstrado que *N. caninum* pode apresentar diminuição de patogenicidade *in vivo* quando mantido por muito tempo exclusivamente em cultivo celular. Sendo assim, era esperado que a patogenicidade fosse mais acentuada no isolado mais recente, que provavelmente teria suas características selvagens preservadas. Entretanto, somente uma (12,5%) das oito fêmeas inoculadas com o Nc-Bahia apresentou abortamento, enquanto cinco (100%) das cinco fêmeas que receberam inóculo de Nc-1 abortaram.

Os resultados obtidos na infecção experimental com Nc-Bahia foram semelhantes aos encontrados por Rojo-Montejo et al. (2009), na Espanha, que inocularam vacas prenhes no septuagésimo dia gestacional, pela via EV, com 10^7 taquizoítos de um isolado denominado Nc-Spain, e não observaram morte fetal, enquanto houve morte fetal em três de cinco vacas inoculadas com Nc-1 com os mesmo procedimentos.

Durante a preparação das doses infectantes, foi possível a percepção de diferença na velocidade do crescimento dos taquizoítos em células VERO entre os isolados. Enquanto o tapete celular era quase completamente destruído pelo Nc-1 em dois dias, o Nc-Bahia levava de três a quatro dias para apresentar o mesmo efeito. Rojo-Montejo et al. (2009) também verificaram menor velocidade de crescimento em cultivo celular de células VERO do Nc-Spain quando comparado ao Nc-1. Sendo assim, é possível que a velocidade de crescimento em cultivo celular possa servir como parâmetro indicativo de patogenicidade *in vivo* de isolados de *N. caninum*.

Em trabalho recente realizado na Argentina com infecção experimental em búfalas, no qual a dose utilizada na inoculação dos animais foi de 10^8 taquizoítos e todos os outros parâmetros foram iguais aos utilizados no presente estudo (isolado Nc-1, via EV, 70º dia gestacional), não se detectou abortamento em nenhuma de três búfalas infectadas (KONRAD et al., 2012). No trabalho realizado na Espanha com vacas, descrito anteriormente, onde novamente houve diferença somente no tamanho do inóculo, permanecendo o isolado, a via de inoculação e o período gestacional idênticos, foram demonstrados abortamentos em três (60%) de cinco vacas (ROJO-MONTEJO et al., 2009). Comparando-se os resultados destes dois trabalhos com os conseguidos neste estudo, sugere-se que a carga parasitária ao

DISCUSSÃO

qual o animal suscetível foi exposto é de suma importância à evolução da neosporose.

A metodologia adotada na infecção experimental possibilitou a comparação entre a patogenicidade dos isolados, nas duas espécies de grande importância zootécnica, gerando resultados significativos. Mantendo-se todas as variáveis constantes (animais, ambiente, alimentação, inóculo, via de inoculação, período gestacional) e alternando-se somente o tipo de *N. caninum* utilizado como inóculo, foi possível demonstrar que o isolado brasileiro Nc-Bahia é de fato menos patogênico que o isolado padrão Nc-1, já que causa menos abortamentos e menor quantidade de lesões histológicas ($p < 0,05$).

Nenhuma das búfalas ou vacas inoculadas apresentou morte fetal no 28º DPI, como ocorrido no trabalho no qual o delineamento foi baseado (MACALDOWIE et al., 2004). Os grupos experimentais foram abatidos assim que a ausência de batimentos cardíacos fetais era detectada por exame ultrassonográfico. O método possibilitou a visualização das lesões histopatológicas em mãe, feto e anexos fetais no momento mais próximo à sua ocorrência, garantindo assim uma análise mais acurada da relação patógeno-hospedeiro durante a prenhez.

Os grupos 1 e 2 foram abatidos ao 42º DPI, na detecção de abortamento em uma das vacas inoculadas, no 112º dia gestacional. Todas as búfalas e vacas dos grupos experimentais 3 e 4 apresentaram abortamento no 35º DPI e foram abatidas, quando estavam no 105º dia da gestação. O delineamento experimental deste estudo estava focado no trimestre inicial da gestação dos ruminantes estudados, dado que este é considerado o mais importante em relação à ocorrência de danos ao feto e morte fetal em bovinos (INNES et al., 2002; MALEY et al., 2006). Considerando que vacas apresentam gestação média de 287 dias (ALENCAR et al.,

DISCUSSÃO

1999) e as búfalas têm gestação média de 312 dias (HUFANA-DURAN et al., 2004), verifica-se que ao abate destes grupos todas as fêmeas estavam no fim do período desejado neste estudo.

O principal problema causado pelo *N. caninum* é a perda reprodutiva, com morte fetal e consequente abortamento (LÓPEZ-GATIUS et al., 2004, 2005; BARTELS et al., 2006). Assume-se como abortamento a morte do feto entre 42 a 260 dias após sua concepção (THURMOND; PICANSO, 1990), podendo ou não ser visualizada a sua expulsão. A transmissão vertical ocorre quando o parasita consegue atravessar a barreira transplacentária e chegar ao feto (BARR et al., 1994).

Houve relato de transmissão vertical em búfala prenhe infectada naturalmente, sendo encontrado o DNA do parasita no cérebro de seu feto (CHRYSSAFIDIS et al., 2011). Também foi relatada a detecção de alterações morfológicas em feto de búfala infectada experimentalmente (KONRAD et al., 2012). No presente estudo foi possível a confirmação da patogenicidade do agente nesta espécie com a detecção de abortamento em três búfalas prenhes, negativas para *N. caninum* e outros agentes abortivos importantes, mantidas com alimentação e ambiente controlados, quando inoculadas com o isolado Nc-1. As três búfalas inoculadas com o isolado Nc-Bahia, mantidas sob mesmos parâmetros de controle alimentar e ambiental, mantiveram seus fetos viáveis até o 42º DPI. Dado que a maior parte dos abortamentos ocorre em terço médio (LÓPEZ-GATIUS, PABÓN, ALMERÍA, 2004), não é possível desconsiderar a possibilidade de que estas búfalas viessem a abortar se a gestação fosse mantida por período mais prolongado.

Ambos os isolados de *N. caninum* utilizados neste estudo foram capazes de comprometer a viabilidade fetal em fêmeas bovinas, embora tenha sido encontrada

DISCUSSÃO

diferença na frequência da morte fetal (20% com a cepa Nc-Bahia; 100% com a cepa Nc-1; $p < 0,05$). Trabalhos anteriores já haviam demonstrado a patogenicidade do isolado Nc-1 para a espécie bovina (KRITZNER et al., 2002; MALEY et al., 2003, MACALDOWIE et al., 2004). Entretanto, esta foi a primeira vez em que o isolado Nc-Bahia é utilizado em infecções experimentais. Baseando-se nas diferentes patogenicidades aqui observadas entre os isolados de *N. caninum* utilizados, seria importante a repetição dos procedimentos empregados neste estudo com isolados obtidos de búfalos naturalmente infectados do Brasil, a fim de verificação mais detalhada da relação entre este protozoário e o hospedeiro bubalino.

Foram analisados por semi-nested PCR os tecidos cerebrais maternos e fetais, tecidos cardíacos maternos e fetais, tecido pulmonar fetal e fragmentos de placentônio provenientes de todos os animais inoculados experimentalmente com ambos os isolados. Os demais tecidos não foram analisados por serem considerados de menor importância para este parasita e pelos bons resultados obtidos com os tecidos estudados. O DNA do parasita foi detectado nos fetos, nas placentas e nas fêmeas infectadas pelos isolados Nc-Bahia e Nc-1, confirmando a ocorrência de infecção sistêmica e de transmissão vertical em ambos os casos, mesmo nos fetos que permaneceram vivos. Em outros trabalhos, o teste de PCR também foi utilizado para a confirmação da infecção (MALEY et al., 2003, MACALDOWIE et al., 2004; ROJO-MONTEJO et al., 2009; KONRAD et al., 2012). Houve diferença significativa entre a frequência da positividade nos tecidos provenientes dos bubalinos (86,11%) em relação aos bovinos (42,86%). Esta informação sugere que a infecção estaria mais disseminada no organismo das búfalas comparativamente às vacas.

Todas as búfalas e vacas prenhes infectadas apresentaram resposta humoral específica ao *N. caninum*, mostrando-se positivas em ambas as técnicas utilizadas para o monitoramento da resposta imune humoral. Dada a geração de resultados paramétricos no teste de ELISA indireto, é possível a montagem de gráficos com as curvas de evolução da resposta imune ao longo do tempo, sem a necessidade de transformação logarítmica, facilitando a análise dos dados obtidos. Os resultados obtidos na RIFI não apresentaram a mesma distribuição progressiva crescente com o decorrer da infecção, entretanto, também foram positivos. Com a RIFI foram observadas flutuações dos títulos ao longo do período experimental, especialmente com as amostras de bubalinos. Tal fato pode estar relacionado com o método de produção do conjugado, que é policlonal e contra os anticorpos totais desta espécie. Portanto, aquele conjugado poderia estar detectando respostas menos específicas, como a imunoglobulina M (IgM), produzida em grande quantidade na fase inicial da resposta imune, sendo posteriormente substituída pela IgG, mais específica (PEREIRA; WEBSTER; PLATTS-MILLS, 1982).

Embora o teste ELISA utilizado seja produzido para bovinos, é utilizado na rotina em centros de diagnóstico com sucesso há bastante tempo e os resultados obtidos neste estudo validam seu uso. Observando-se os resultados verificados e os gráficos montados, o ELISA indireto demonstrou ser mais adequado para o monitoramento da resposta imunológica humoral de bovinos e bubalinos experimentalmente infectados por *N. caninum*, permitindo um melhor acompanhamento da evolução dessa resposta imune.

Foi detectada diferença significativa entre as respostas sorológicas das duas espécies, sendo que a espécie bovina apresentou maior produção de anticorpos. Dada a menor resposta imunológica das búfalas, existe a possibilidade desta

DISCUSSÃO

espécie coexistir a mais tempo com *N. caninum* que a espécie bovina (HASEGAWA, 1999). Corroborar para esta conclusão a maior positividade encontrada na semi-neste PCR dos tecidos bubalinos em relação aos bovinos. Havendo maior adaptação entre as espécies, seria gerada menor resposta imunológica do hospedeiro ao parasita, possibilitando sua maior disseminação pelo organismo parasitado.

Com ambos os testes sorológicos utilizados não foi detectada soroconversão em nenhum dos fetos estudados, mesmo nos que vieram a óbito. Tal constatação provavelmente se deve à fase gestacional precoce em que se encontravam os fetos, quando os tecidos linfóides não estão completamente formados, prejudicando a função imunológica em geral (OSBURN, 1986; WOUDA; DUBEY; JENKINS, 1997; KONRAD et al., 2012).

Não foram encontradas lesões nas placentas das búfalas infectadas com o isolado Nc-Bahia, embora tenha sido detectado o DNA do parasita em todas as amostras examinadas deste tecido. Houve placentite não supurativa leve em duas (40%) das cinco vacas inoculadas com o mesmo isolado e placentite não supurativa grave, com extensa necrose, na única vaca deste grupo que apresentou abortamento. Nos grupos inoculados com o isolado Nc-1, foi detectada placentite não supurativa, necrose e fibrose disseminada nos tecidos das búfalas e das vacas, sendo as lesões mais graves e extensas nas placentas bovinas.

Nas placentas foi encontrada inflamação não supurativa de intensidade leve a grave, algumas vezes com presença de macrófagos ou plasmócitos, também com necrose e fibrose difusa. A gravidade das alterações encontradas foi em geral maior nos animais infectados com o isolado mais patogênico. As lesões estavam em sua maioria localizadas na porção materna, tal que somente em uma amostra de vaca

infectada com o isolado Nc-Bahia (V1) foi detectada necrose na porção fetal. Na grande maioria, as vilosidades fetais estavam relativamente preservadas comparando-se às carúnculas maternas. Os resultados aqui encontrados estão em consonância com os obtidos em estudos anteriores (MACALDOWIE et al., 2004; ROJO-MONTEJO et al., 2009; KONRAD et al., 2012). Estas lesões na parte materna da placenta podem diminuir a oxigenação fetal e a passagem de nutrientes, sendo as prováveis causadoras do abortamento (DUBEY et al., 1992).

A principal alteração tecidual encontrada nos diversos tecidos fetais provenientes de animais inoculados com ambos os isolados foi a infiltração de células mononucleares. Foram observadas gliose e satellitose no cérebro dos fetos, com maior ocorrência nos inoculados com Nc-1. Houveram também alterações detectáveis em fígado, coração, pulmão, musculatura esquelética e rins fetais, com lesões mais graves nos animais inoculados com o isolado mais patogênico. Buxton, McAllister e Dubey (2002) relataram as mesmas lesões em fetos naturalmente infectados, assim como foram descritas lesões semelhantes em diversos outros estudos (DUBEY et al., 1992; MALEY et al., 2003; MACALDOWIE et al., 2004; INNES et al., 2005; MALEY et al., 2006; ROJO-MONTEJO et al., 2009; KONRAD et al., 2012).

Os resultados encontrados nestas análises histopatológicas estão compatíveis com os resultados encontrados por outros grupos, mesmo nos animais onde não foi visto abortamento. A infecção por *N. caninum* pode causar inflamação leve a grave no cérebro, medula espinhal, olhos, músculo esquelético, coração, pele, fígado, rim, e pulmões, com resposta celular linfocitária predominante, podendo haver macrófagos. Em infecções mais avançadas podem existir plasmócitos

DISCUSSÃO

(BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; MACALDOWIE et al., 2004; MCALLISTER, 2005).

O estado geral do feto morto inoculado com o isolado Nc-Bahia pareceu ser pior que o dos fetos mortos obtidos com o isolado Nc-1 provavelmente devido ao tempo decorrido entre a morte fetal e sua detecção por exame ultrassonográfico. Considerando que este exame era realizado uma vez por semana, o feto pode ter vindo a óbito logo após o exame realizado na sétima semana, sendo detectado somente na semana seguinte. As lesões observadas nos fetos foram semelhantes, sendo diferente apenas o estado autolítico observado no feto obtido em período mais tardio da gestação. A autólise não foi considerada lesão tecidual causada pelo *N. caninum* naquele feto.

Com a categorização ordinal dos resultados obtidos na análise histopatológica e aplicação do teste de estatístico U de Mann-Whitney, foi verificada variação significativa entre a severidade das lesões encontradas nos tecidos das búfalas e das vacas, sendo a espécie bovina mais afetada pelo parasita. Também foi verificada diferença entre as lesões causadas pelos diferentes isolados utilizados na infecção experimental. As informações obtidas na análise histológica das amostras obtidas neste estudo fortalecem as observações indicadas anteriormente, em relação à diferença de resposta imunológica entre as espécies hospedeiras e diferença de patogenicidade entre os isolados de *N. caninum*. A mesma relação de diferença entre a gravidade de lesões causadas por diferentes isolados foi relatada em estudo realizado na Espanha (ROJO-MONTEJO et al., 2009).

A baixa detecção de positividade na IHC realizada com os tecidos dos animais infectados é justificada pelas características inerentes à técnica. Trabalhos anteriores já citaram a baixa sensibilidade da técnica, com pouca ocorrência de

positividade em amostras sabidamente infectadas (SAWADA et al., 2000; OKEOMA et al., 2004; DE MEERSCHMAN et al., 2005; MCALLISTER, 2005; DUBEY et al., 2006; ALVES NETO et al., 2011; BANDINI et al., 2011).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados da infecção experimental de vacas e búfalas prenhes, com 5×10^8 taquizoítos de diferentes isolados de *N. caninum*, no período inicial da gestação, pôde-se concluir:

- Foi confirmado o abortamento nas búfalas prenhes causado pela infecção experimental com isolado Nc-1 de *N. caninum*.
- O isolado Nc-Bahia não provocou abortamento nas búfalas prenhes infectadas.
- Houve abortamento em vacas inoculadas com os isolados Nc-Bahia e Nc-1 de *N. caninum*.
- Ambos os isolados de *N. caninum* geraram lesões teciduais em búfalas, vacas e seus respectivos fetos.
- Ocorreu transmissão vertical em fêmeas bovinas e bubalinas inoculadas com Nc-Bahia e Nc-1.
- Resposta imune humoral específica ao *N. caninum* foi verificada em búfalas e vacas à partir do 14º dia pós-infecção.

- Não foi detectada resposta imunológica humoral nos fetos, inclusive nos que vieram a óbito.
- Nc-Bahia e Nc-1 apresentaram diferença de patogenicidade, sendo o primeiro menos patogênico em ambas as espécies animais estudadas.
- Parece haver maior adaptação entre o parasita e a espécie bubalina, evidenciada pela maior disseminação do agente nos tecidos estudados, menores níveis de resposta imunológica humoral e lesões menos acentuadas verificadas nas fêmeas bubalinas, em comparação com as fêmeas bovinas.

REFERÊNCIAS

- ADRIANARIVO, A. G., ANDERSON, M. L., ROWE, J. D., GARDNER, I. A., REYNOLDS, J. P., CHOROMANSKI, L., CONRAD, P.A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitology Research**, v. 96, p. 24-31, 2005.
- ALENCAR, M. M., BARBOSA, P. F., TREMATORE, R. L., OLIVEIRA, J. A. L. Peso ao parto, período de gestação e desempenho produtivo de vacas da raça nelore e cruzadas tabapuã x gir. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: SBZ, 1996, p.130-132.
- ALMERIA, S., DE MAREZ, T., DAWSON, H., ARAÚJO, R., DUBEY, J. P., GASBARRE, L. C. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 100 days of gestation. **Parasite Immunology**, v.25, p.383-392, 2003.
- BARTLEY, P. M., KIRVAR, E., WRIGHT, S., SWALES, C., ESTEBAN-REDONDO, I., BUXTON, D., MALEY, S. W., SCHOCK, A., RAE, A. G., HAMILTON, C., INNES, E. A. Maternal and fetal responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v.130, p.81-91, 2004.
- BARTLEY, P. M., WRIGHT, S., SALES, J., CHIANINI, F., BUXTON, D., INNES, E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v. 133, p. 421-432, 2006.
- BARUSELLI, P. S. Manejo reprodutivo de bubalinos. **Instituto de Zootecnia – Estação Experimental do Vale do Ribeira**, Monografia, 46p, 1993.
- BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; BERBER, R. C. A.; AMARAL, R. Timed insemination using synchronization of ovulation in buffalo. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2000, Estocolmo. **Anais...** Estocolmo: s.e., 2000, v. 2, p. 14-18.

BARR, B. C. ROWE, J. D., SVERLOW, K. W., BONDURANT, R. H., ARDANS, A., OLIVER, M. N., CONRAD, P. A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 207-215, 1994.

BASZLER, T. V.; GAT, L. J. C.; LONG, M. T.; MATHISON, B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4059-4064, 1999.

BJERKAS, I; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeithschriff Fuer Parasitenkunde**, v.70, p. 271-274, 1984.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; THOMPSON, K. M.; RAE, A. G.; INNES, E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, n. 4, pg. 267-279, 1998.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M., DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18(12), p. 546-552, 2002.

CAMPERO, C. M., PEREZ, A., MOORE, D. P., CRUDELI, G., BENITEZ, D., DRAGHI, M. G., CANO, D., KONRAD, J. L., ODEON, A. C. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four ranches in Corrientes province, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 155–158, 2007.

CARDOSO, J. M. S., AMAKU, M., ARAÚJO, A. J. U. S. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Veterinary Parasitology**, doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.019, 2012.

CHRYSSAFIDIS, A. L., SOARES, R. M., RODRIGUES, A. A. R., CARVALHO, N. A. T., GENNARI, S. M. Evidence of congenital transmission of *Neospora caninum* in naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) fetus from Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 741-743, 2011.

CONSTANTIN, E. M., SCHARES, G., GROMANN, E., SAUTER, K., ROMIG, T., HARTMANN, S. Untersuchungen zur Rolle des Rotfuchses (*Vulpes vulpes*) als möglicher Endwirt von *Neospora caninum*. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.** v.124, p. 148–153, 2011.

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F.; GONDIM, L. F. P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, pg. 195-202, 2002.

DAVISON, H. C., OTTER, A., TREES, A. J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1189-1194, 1999.

DE MAREZ, T.; LIDDEL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1647-1657, 1999.

DE MEERSCHMAN, F., FOCANT, C., DETRY, J., RETTINGER, C., CASSART, D., LOSSON, B. Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. **Veterinary Record**, v., 157, p. 115-118, 2005.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDE, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 747-752, 2001.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, L. J.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L., LINDSAY, D. S., TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 1578-1579, 1989.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L.; DAVIS, S. W.; SHEN, S. K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 709-713, 1992.

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

DUBEY, J. P.; ROMAND, S.; HILALI, M.; KWOCK, O. C.; THULLIEZ, P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. **International Journal for Parasitology**, v. 28(3), p. 527-529, 1998.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 214, p. 1160-1163, 1999.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, 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.; MATTSON, J. G.; McALLISTER, M. M.; MODRY, D. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 382-387, 2011.

EIRAS, C., ARNAIZ, I., ALVAREZ-GARCIA, G., ORTEGA-MORA, L. M., SANJUANL, M. L., YUS, E., DIEGUEZ, F. J. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef

cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, p. 128–132, 2011.

FUJII, T. U.; KASAI, N.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. L. P.; BARUSELLI, P. S.; NISHI, S. M.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M. Anticorpos anti-*Neospora caninum* e contra outros agentes de abortamentos em búfalas da região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 68, n. 2, p. 5-9, 2001.

GENNARI, S. M.; RODRIGUES, A. A.; VIANA, R. B.; CARDOSO, E. C. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134 (1-2), p. 169-171, 2005.

GONDIM, L. F. P.; SOUZA, R. M.; GUIMARÃES, J. E.; ALMEIDA, M. A. O. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em búfalos criados no Estado da Bahia. In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 11., 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, BA: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999(a), p. 227.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, 1999(b).

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESUS, E. E. V.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDES, H. S.; ALMEIDA, M. A. O.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; McALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 1-7, 2001.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; McALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 144, p. 1159-1163, 2002.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.159-161, 2004.

GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; CARRO-CORAL, C.; MEZO, M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101, p. 58-64, 2011.

GUARINO, A.; FUSCO, G.; SAVINI, G.; DI FRANCESCO, G.; CRINGOLI, G. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 91, p. 15-21, 2000.

GUY, C. S.; WILLIAMS, D. J. L.; KELLY, D. F.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; BJÖRKMAN, C.; SMITH, R. F.; TREES, A. J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. **Veterinary Record**, v.149, p.443-449, 2001.

HAJIKOLAEI, M. R. H., GORANINEJAD, S., HAMIDINEJAT, H., GHORBANPOUR, M., PARYAB, R. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bulalis*) from the south-western region of Iran. **Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy**, v. 51, p. 233–235, 2007.

HASEGAWA, H. Phylogeny, host-parasite relationship and zoogeography. **Korean Journal of Parasitology**, v. 37, n. 4, p. 197-213, 1999

HUONG, L. T.; LJUNGSTROM, B. L.; IGGLA, A.; BJORKMAN, C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. **Veterinary Parasitology**, v. 75, p. 53-57, 1998.

HUFANA-DURAN, D.; PEDRO, P. B.; VENTURINA, H. V.; HUFANA, R. D. SALAZAR, A. L.; DURAN, P. G.; CRUZ, L. C. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Theriogenology**, v. 61, n. 7, p. 1429-1439, 2004.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**, v. 37, p.1-55, 2009

INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M.; BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1523-1534, 2001.

INNES, E. A., ADRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 29-36, 2005.

INNES, E. A. Immune responses to *Neospora caninum*. In: I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*, 9., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo, SP: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ – USP, 2005, p. 11.

JENSEN, L., JENSEN, T. K., LIND, P., HENRIKSEN, S. A., UGGLA, A., BILLE-HANSEN. Experimental porcine neosporosis. **Acta Scandinavia of Pathology, Microbiology and Immunology**, v. 106, p. 475–482, 1998.

KHAN, M. A., NIAMATULLAH, M. Buffalo versus vattle? Let us close up this controversy and concentrate on improving the productivity of buffalo. In: 9TH WORLD BUFFALO CONGRESS, 2010, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires : s.e., 2010, p. 1043-4045.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P.A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

KOBAYASHI, Y., YAMADA, M., OMATA, Y., KOYAMA, T., SAITO, A., MATSUDA T., OKUYAMA K., FUJIMOTO S., FURUOKA H., MATSUI T. Naturally-occurring

Neospora caninum infection in an adult sheep and her twin fetuses. **The journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 434-436, 2001.

KONNAI, S., MINGALA, C. N., SATO, M., ABES, N. S., VENTURINA, F. A., GUTIERREZ, C. A., SANO, T., OMATA, Y., CRUZ, L. C., ONUMA, M., OHASHI, K. A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with abortion problems. **Acta Tropica**. v. 105, p. 269–273, 2008.

KONRAD, J. L., MOORE, D. P., CRUDELI, G., CASPE, S. G., CANO, D. B., LEUNDA, M. R., LISCHINSKY, L., REGIDOR-CERRILLO, J., ODEÓN, A. C., ORTEGA-MORA, L. M., ECHAIDE, I., CAMPERO, C.M. Experimental inoculation of *Neospora caninum* in pregnant water buffalo. **Veterinary Parasitology**, doi:10.1016/j.vetpar.2011.12.030, 2012.

KRITZNER, S.; SAGER, H.; BLUM, J.; KREBBER, R.; GREIF, G.; GOTTSTEIN, B. An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 1, n. 4, p. 1-10, 2002.

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

LOPEZ-GATIUS, F., LOPEZ-BEJAR, M., MURUGAVEL, K., PABON, M., FERRER, D., ALMERIA, S. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in northeast Spain. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 51 p. 348-352, 2004.

LOPEZ-GATIUS, F., PABON, M., ALMERIA, S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 606-313, 2004.

LOPEZ-GATIUS, F., GARCIA-ISPIERTO, I., SANTOLARIA, P., YANIZ, J. L., LOPEZ-BEJAR, M., NOGAREDA, C., ALMERIA, S. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 52 p. 147-152, 2005.

MACALDOWIE, C.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 131, p. 142-156, 2004.

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; RAE, A. G.; WRIGHT, S. E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C.M.; SALES, J.; INNES, E. A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v.129, n.2-3, p.186-195, 2003.

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; MACALDOWIE, C. N.; ANDERSON, I. E.; WRIGHT, S. E.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; HAMILTON, C. M.; STORSET, A. K.; INNES, E. A. Characterization of the response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v.135, p.130-141, 2006.

McALLISTER, M. M., DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., JOLLEY, W. R., WILLS, R. A., McGUIRE, A. M., Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, M. M. The comparative pathology of neosporosis. In: I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*, 9., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo, SP: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ – USP, 2005, p. 13.

NANDA, A. S.; NAKAO, T. Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: current status and future prospectus. **Animal Science Journal**, v. 74, n. 6, p. 443-455, 2003.

NASIR, A., ASHRAF, M., KHAN, M. S., YAQUB, T., JAVEED, A., AVAIS, M., AKHTAR, F. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy buffalo in Lahore District. Pakistan. **Journal of Parasitology**, p. 541–543, 2011.

NETO, A. F. A.; BANDINI, L. A.; NISHI, S. M.; SOARES, R. M.; DRIEMEIER, D.; ANTONIASSI, N. A. B.; SCHARES, G.; GENNARI, S. M. Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. **Journal of Parasitology**, v. 97, p. 135-139, 2011.

ORBURN, B. I. Ontogeny of immune responses in cattle. Em: Morrison, W.I. (ed) **The ruminant Immune System in Health and Disease**, Cambridge University Press, Cambridge, p.252-260, 1986.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 273-275, 1995.

PAULA, V. S. O.; RODRIGUES, A. A. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. Evaluation of a PCR based on primers to *Nc5* gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. **Veterinary Research Communications**, v. 28, p. 581-585, 2004.

PEREIRA, S., WEBSTER, D., PLATTS-MILLS, T. Immature B cells in fetal development and immunodeficiency: Studies of IgM, IgG, IgA and IgD production in vitro using epstein-Barr virus activation. **European Journal of Immunology**, v. 12, n. 7, p. 540-546, 1982.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; CORRÊA, A.; SCHMITZ, M.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Abortamento bovino por *Neospora caninum*: fatores associados ao resultado positivo da imunohistoquímica. In: I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, 9., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo, SP: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ – USP, 2005, p. 18.

QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, pg. 391-394, 2002.

RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos

provenientes de seis diferentes estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

RAMAMOORTHY, S. SRIRANGANATHAN, N., LINDSAY, D. S. Gerbil model of acute neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 111-114, 2005.

REICHEL, M. P. A review of the economic impact of *Neospora caninum*. In: 23RD INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires : [s.n.], 2011, p. 69.

RODRIGUES, A. A.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C.; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 3-4, p. 139-150, 2004.

RODRIGUES, A. A. R.; GENNARI, S. M.; PAULA, V. S. O.; AGUIAR, D. M.; FUJII, T. U.; STARKE-BUZETI, W.; MACHADO, R. Z.; DUBEY, J. P. Serological responses to *Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 21-24, 2005.

ROJO-MONTEJO, S., COLLANTES-FERNANDEZ, E., BLANCO-MURCIA, J., RODRIGUEZ-BERTOS, A., RISCO-CASTILLO, V., ORTEGA-MORA, L. M. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary Research**, n. 2, p. 40-49, 2009.

SANTOS, A. P. M. E.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; BRACARENSE, A. P. R. F. L. *Neospora caninum* em vacas leiteiras no Estado do Paraná, Brasil: análise histológica e imuno-histoquímica em fetos. **Revista Semina**, v. 26, n. 4, p. 559-562, 2005.

SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M. Y.; CANAVESSI, A. M. O.; PINCKNEY, R. D. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. **Revista Semina**, v. 24, n. 1, p. 3-10, 2003.

SAWADA, M., KONDO, H., TOMIOKA, Y., PARK, C. H., MORITA, T., SHIMADA, A., UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 853-854, 2000.

SILVA, M. S. T.; LOURENCO Jr., J. B.; MIRANDA, H. A.; ERCHESSEN, R.; FONSECA, R. F. S. R.; MELO, J. A.; COSTA, J. M. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – **PRONAF**. Belem, PA: CPATU, 2003.

SOUZA, L. M.; NASCIMENTO, A. A.; FURUTA, P. I.; BASSO, L. M. S.; SILVEIRA, D. M.; COSTA, A. J. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Semina**, v. 22, n. 1, p. 39-48, 2001.

SURYANTO, B.; ARIFIN, M.; RIANTO, E. Potential of swamp buffalo in development in Central Java, Indonesia. **Buffalo Bulletin**, v. 21, p. 3-9, 2002.

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

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, p.1381-1385, 1997.

VOGEL, F. S. F.; ARENHART, S.; BAUERMAN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1948-1951, 2006.

WILLIAMS, D. J.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R. F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v.121, p.347-358, 2000.

WILLIAMS, D. J.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; GUY, F.; MCGARRY, J. W.; MCKAY, J. S.; TREES, A. J. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. **International Journal of Parasitology**, v. 33, n. 10, pg. 1059-1065, 2003.

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

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

YU, J.; XIA, Z.; LIU, Q.; LIU, J.; DING, J.; ZHANG, W. Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3, p. 79-85, 2007.