

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

KAMILA ALCALÁ GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS E DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES
NO ENCÉFALO DE CAMUNDONGOS BALB/c EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS POR *Neospora caninum* E INFECÇÃO NATURAL EM OVINOS NO
PARANÁ**

CURITIBA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

KAMILA ALCALÁ GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS E DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES
NO ENCÉFALO DE CAMUNDONGOS BALB/c EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS POR *Neospora caninum* E INFECÇÃO NATURAL EM OVINOS NO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dr^a. Rosângela Locatelli Dittrich

CURITIBA
2016

G635 Gonçalves, Kamila Alcalá

Caracterização biológica de isolados e distribuição das lesões no encéfalo de camundongos Balb/c experimentalmente infectados por *Neospora caninum* e infecção natural em ovinos no Paraná. Kamila Alcalá Gonçalves. / Curitiba: 2016.

101 f. il.

Orientadora: Rosangela Locatelli Dittrich
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

1. *Neospora caninum*. 2. Camundongo – Caracterização biológica. 3. Ovino – Caracterização patológica. 4. Neosporose ovina - Paraná I. Dittrich, Rosangela Locatelli. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 619:636.3(816.2)



Ata da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Kamila Alcalá Gonçalves, área Ciências Veterinárias, do PPGCV realizada em 22.03.2015.

Às quatorze horas e trinta minutos do dia vinte e dois de março do ano dois mil e dezesseis, no Anfiteatro do Hospital Veterinário do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, reuniu-se a Comissão Examinadora constituída pelos seguintes membros Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich; Professora Dra. Juliana Sperotto Brum e a Professora Dra. Mary Suzan Varaschin com a finalidade de arguir a mestranda **KAMILA ALCALÁ GONÇALVES** candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, área Ciências Veterinárias, que ofereceu para análise da Comissão a Dissertação intitulada "**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS E DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES NO ENCÉFALO DE CAMUNDONGOS BALB/c EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Neospora caninum* E INFECÇÃO NATURAL EM OVINOS NO PARANÁ**". Abertos os trabalhos a candidata, cumprindo determinação regimental, fez uma breve exposição oral a respeito de sua Dissertação. Terminada a exposição, a Presidente Professora Doutora Rosângela Locatelli Dittrich declarou aberta a arguição da candidata pelos membros da banca, finalizada pela própria Presidente. Concluída a arguição, a Comissão Examinadora reuniu-se para avaliar a Candidata. A Comissão Examinadora considerou que a Dissertação

tem mérito científico, com escrita adequada.

Quanto à apresentação da Candidata durante a Defesa, a Comissão Examinadora.....

considerou que a candidata fez uma boa apresentação e respondeu as questões

Reabertos os trabalhos, de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE, a candidata foi considerada APTA para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Ciências Veterinárias, encerrando os trabalhos da Defesa de Dissertação dos quais, eu, RLO, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada RLO e por todos os Membros da Comissão Examinadora. Curitiba, 22 de março de 2016.

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Mary Suzan Varaschin
Membro

Professora Dra. Juliana Sperotto Brum
Membro

*Àos meus pais (Adilson e Sueli) que sempre
me apoiaram e ajudaram a relizar meus
sonhos...*

Meus exemplos de perserverança, amor e fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me orientar e guiar em todos os momentos da minha vida. Por ser a luz do meu caminho, meu ajudador.

À minha família, que sempre me apoiou, amou e cuidou, que sempre me incentivou a buscar meus sonhos e a não desistir facilmente, sem medir esforços para me ajudar. À minha irmã Karina e ao meu irmão Robinson que sempre foram meus exemplos, por toda dedicação, interesse, empenho, sendo excelentes profissionais, irmãos e filhos. À minha mãe Sueli por todo carinho, amor e confiança, por acreditar em mim e sempre me incentivar, apoiar e encorajar a seguir meus sonhos. À meu pai Adilson que sempre sonhou com a minha formação, que acredita em mim, me ama e nunca deixou de me aconselhar em todas as minhas decisões, respeitando-as. À vocês agradeço. Amo muito todos.

Ao meu namorado Alfredo, que me entende, respeita e ajuda, e que além de tudo é meu melhor amigo. Quando estou com você eu recarrego minhas forças, encontro amor, alegria e segurança. Eu te amo muito, obrigada por tudo.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Rosangela Locatelli Dittrich, que durante todo o projeto foi uma excelente orientadora. Obrigada pela paciência, pela disponibilidade e pela confiança. Com certeza, este período do mestrado contribuiu muito para meu crescimento profissional e agradeço pela oportunidade.

À toda equipe do biotério do Setor de Ciências Biológicas, por toda ajuda, auxílio e disponibilidade.

Àos residentes e professores do Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Lavras, por toda ajuda, disponibilidade e acolhimento.

Ào Prof. Dr. José Guilherme Xavier, à Prof^a Dr^a Silvia Regina Kleeb, ào Prof. Renato Silva de Sousa e ào Prof. Dr. Antônio Waldir C. da Silva a minha eterna admiração e gratidão pelos ensinamentos.

Agradeço, àos médicos veterinários Daniele Von Kruger, Sandra Seixas, Gabriela Maffezzoli, Ana Paula Bush, Marília Koch, Luciane Laskoski e ào bioquímico Olair Beltrame, equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná e àos médicos veterinários, Thierry Grima de Cristo e Claudia Martins Galindo do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda constante, conversas e risadas. Àos amigos e médicos veterinários Carlos Kroetz, Rafael Hideki Hagi, Yara de Oliveira Brandão, Daniella Matos da Silva,

Julia Dall Anese, Paulo Ribeiro-Filho, Monalisa Lukascek de Castro, Natasha Villas Boas de Olaechea, Luana Torres, Marina Biscolla, Renata Galleti, Andressa Martins, Bianca Aparecida e Livia Sayuri pela amizade eterna, apoio, risadas, diversões e carinho.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade e por estimular a pesquisa, através do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior – Capes, pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Louvai ao Senhor, porque ele é bom;
porque sua benignidade é para sempre”.*

(Salmos 136:1).

RESUMO

A neosporose é causada pelo parasito coccídeo, intracelular obrigatório, *Neospora caninum*. A doença acomete principalmente bovinos e cães, e ocasionalmente ovinos e caprinos. O protozoário infecta os tecidos dos animais, sendo o sistema nervoso central o principal local da infecção. Contudo, há poucos estudos que descrevem a distribuição e intensidade das lesões causadas pelo *N. caninum* neste tecido. No mundo diferentes tipos de cepas de *Neospora caninum* estão sendo isoladas e caracterizadas, assim como no Brasil, verificando que há diferenças de patogenicidade entre os isolados. A importância econômica da doença está associada a problemas reprodutivos, como abortos, principal sinal clínico observado na espécie bovina. As ovelhas também podem apresentar distúrbios reprodutivos quando infectadas com o protozoário e apesar do Brasil ser o maior produtor de ovinos da América Latina, as informações sobre neosporose em ovinos são escassas no país. O objetivo do primeiro capítulo deste estudo foi realizar a caracterização biológica de duas cepas de *Neospora caninum* (BNc-1 e BNc4-PR), isoladas no Paraná (Brasil) e mapear a distribuição e a intensidade das lesões causadas pela cepa NC-1 de *N. caninum*, no encéfalo de camundongos BALB/c experimentalmente infectados. Para tanto, foram utilizados 45 camundongos da raça BALB/c, separados em três grupos principais, de acordo com a cepa inoculada (NC-1, BNc-1 e BNc4-PR), sendo avaliados em períodos distintos (30, 60, 90, 120 e 180 dias) pós-inoculação (p.i). Em relação ao mapeamento das lesões encefálicas, causadas pelo parasito *N. caninum* (cepa NC-1) em camundongos BALB/c, observou-se que a região mais frequentemente afetada foi o mesencéfalo e que a intensidade das lesões diminuiu de acordo com a evolução da doença. A caracterização biológica das cepas BNc-1 e BNc4-PR, isoladas no Paraná, revelou que a cepa BNc4-PR causa encefalite não supurativa, discreta, no lobo frontal de camundongo BALB/c avaliado no período de 30 dias (p.i). Porém a cepa BNc4-PR, assim como a cepa BNc-1 demonstrou ser menos patogênica que a cepa NC-1, utilizada como controle, um vez que não foram visualizadas lesões histopatológicas no encéfalo dos camundongos inoculados com a cepa BNc-1. Através da caracterização biológica de isolados, da análise da distribuição e intensidade das lesões causadas por *N. caninum* no encéfalo de modelos experimentais, foi verificada a patogênese da doença e as variações de patogenicidade entre os isolados. Estes resultados contribuem para o diagnóstico da doença. No segundo capítulo deste trabalho, o objetivo foi relatar casos de infecção

natural por *N. caninum* em cordeiros natimorto e recém-nascido doente, no estado do Paraná – Brasil. Foi realizado em amostras encefálicas do cordeiro natimorto e recém-nascido doente, exame histopatológico, imuno-histoquímico (IHQ) e a reação em cadeia da polimerase (PCR). O exame histopatológico do encéfalo dos cordeiros natimorto e recém-nascido doente, demonstrou lesões típicas da infecção por *N. caninum* no tecido. Cistos intraneuronais de *N. caninum* foram evidenciados pela IHQ, e a PCR das amostras encefálicas foi positiva para *N. caninum*, confirmando a infecção natural dos cordeiros pelo protozoário. Este estudo demonstrou que ovinos infectados naturalmente com o protozoário *Neospora caninum*, podem apresentar alterações similares as observadas em bovinos. Este é o primeiro trabalho no Brasil que relata caso de nascimento de cordeiros natimorto e doente por neosporose.

Palavras-chaves: neosporose; infecção experimental; transmissão vertical; ovino.

ABSTRACT

Neosporosis is caused by the coccidian intracellular parasite, *Neospora caninum*. The disease affects mainly cattle and dogs and, occasionally, sheep and goats. The parasite has the capacity to migrate into the tissues of animals and the central nervous system (CNS) is the principal site of infection. However, there are very few studies aimed at describing the distribution and intensity of the lesions caused by *N. caninum* in this tissue. Different *Neospora caninum* strains have been isolated and characterized worldwide, as well as in Brazil, and a variation in pathogenicity among isolates has been observed. The economic impact of this disease is related to reproductive problems, such as abortions, the major clinical sign observed in cows. Sheep may show reproductive disorders when affected by the protozoan infection and although Brazil is the largest sheep-producing country of Latin America, information on *Neospora caninum* infections in sheep are scarce in the country. The goals of the first chapter of this study are the biological characterization of two *N. caninum* strains (BNc-1 and BNc4-PR) isolated in Paraná (Southern Brazil) and to map the distribution and intensity of the lesions caused by the coccidian parasite *N. caninum* (NC-1 strain) in the brain of experimentally infected BALB/c mice. To this end, we used 45 BALB/c mice separated into three main groups, according to the inoculated strain (NC-1, BNc-1 and BNc4-PR) and they were assessed at different post-inoculation periods (30, 60, 90 120 and 180 days). While mapping the brain lesions caused by the parasite *N.*

caninum (NC-1 strain) in BALB/c mice, it was observed that the midbrain is the most commonly affected site and the intensity of the lesions decreased as the disease progressed. The biological characterization of the strains BNc-1 and BNc4-PR isolated in Paraná revealed that BNc4-PR strain caused discreet non-suppurative encephalitis in the frontal lobe of BALB/c mice, evaluated at the 30-day p.i. period. However, the BNc4-PR strain as well as BNc-1 strain, proved to be less pathogenic than NC-1 strain used as control, since no histopathological lesion was seen in the brain of the mice inoculated with BNc-1 strain. The pathogenesis of the disease and pathogenic variations among the isolates was verified using biological characterization of isolates and the analysis of distribution and intensity of the lesions caused by *N. caninum* in the brain of experimental models. These results contribute to the diagnosis of the disease. The second chapter of this work presents a report of natural infection by *N. caninum* in a stillborn lamb and a sick newborn lamb in the state of Paraná - Brazil. Histopathological examination, immunohistochemistry (IHC) and polymerase chain reaction (PCR) were performed on the lambs' brain samples. Histopathology of the brain tissue from the stillborn lamb and the sick newborn lamb showed typical lesions of *N. caninum* infection. Intraneuronal cysts of *N. caninum* were found by IHC, and the PCR of brain samples were positive for *N. caninum*, confirming natural protozoan infection in sheep. This study demonstrated that sheep naturally infected with *Neospora caninum* can develop similar changes to those observed in cattle. This study is the first to report the birth of stillborn and sick newborn sheep infected with *N. caninum* in Brazil.

Keywords: neosporosis; experimental infection; vertical transmission; ovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Gliose focal, discreta no cérebro de camundongo do grupo A2 inoculado com a cepa BNc4-PR de *N. caninum*, 30 dias (p.i)_____ 39

Figura 2 – Lesões histopatológicas no encefalo de camundongos BALB/c inoculados com a cepa NC-1 de *Neospora caninum*_____ 42

Figura 3 – Imuno-histoquímica positiva para *Neospora caninum* em encéfalo de camundongo BALB/c inoculado com a cepa NC-1, 30 dias (p.i)_____ 43

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Resultado positivo de imunofluorescência indireta da ovelha mãe (titulação 1:100)_____ 73

Figura 2 – Lesão histopatológica no SNC (córtex frontal) do cordeiro 1 infectado por *N. caninum*_____ 74

Figura 3 – Lesão histopatológica no SNC (região de hipocampo) do cordeiro 2 infectado por *N. caninum*_____ 75

Figura 4 – Neosporose em ovinos. Cordeiro 2. Encéfalo - cistos do parasito *N. caninum* intraneuronais_____ 76

Figura 5 – Reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA do protozoários *N. caninum* no encéfalo dos cordeiros 1 e 2_____ 77

Figura 6 – Reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA do protozoários *T. gondii* no encéfalo dos cordeiros 1 e 2_____ 78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Grupos de camundongos por cepa, dose inoculada de *N. caninum* e realização ou não de imunossupressão_____31

Tabela 2 - Período das eutanásias após inoculação dos camundongos com as cepas BNc4-PR, BNc-1 e NC-1 de *N. caninum*_____34

Tabela 3 - Sinais clínicos e resultados dos exames citológico à fresco e histopatológico do grupo A2 (cepa BNc4-PR)_____38

Tabela 4 - Sinais clínicos, exames citológicos à fresco e histopatológicos dos camundongos (grupo C2) inoculados com a cepa NC-1 de *N. caninum*_____40

Tabela 5 - Alterações histopatológicas no encéfalo de camundongos inoculados com a cepa NC-1 (grupo C2), nos períodos de 30, 60 e 120 dias pós-infecção_____41

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

%	-	Porcentagem
°C	-	Graus Celsius
µL	-	Microlitro
µg/mL	-	Microgramas por mililitro
µm	-	Micrômetro
Cm	-	Centímetro
CO ₂	-	Dióxido de carbono
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	-	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<i>et al.</i>	-	(<i>et ali</i>) e outros
FMUSP	-	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ml/L	-	Mililitro por Litro
ML	-	Mililitro
PBS	-	Phosphate buffered saline
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
pH	-	Potencial Hidrogeniônico
p.i	-	Pós-inoculação
PR	-	Paraná
RIFI	-	Reação de imunofluorescência indireta
SCA	-	Setor de Ciências Agrárias
SFB	-	Soro fetal bovino
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SPF	-	Specific-pathogen-free
<i>Taq</i>	-	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	-	Tris-buffered saline
UFLA	-	Universidade Federal de Lavras
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
USA	-	Estados Unidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	16
2. CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES POR NEOSPORA CANINUM NO ENCÉFALO DE CAMUNDONGOS BALB/C EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS DO PARANÁ	23
2.1 INTRODUÇÃO	25
2.2 OBJETIVO GERAL	29
2.2.1 Objetivos específicos	29
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.3.1 Cepas do parasito	30
2.3.2 Cultivo de células Vero	30
2.3.3 Cultivo das cepas NC-1, BNc-1 e BNc4-PR	30
2.3.4. Delineamento experimental <i>in vivo</i>	31
2.3.5 Exame citológico à fresco do encéfalo	32
2.3.6 Exame histopatológico	32
2.3.7 Imuno-histoquímica	33
2.4 RESULTADOS	35
2.4.1 Experimento 1: Caracterização biológica das cepas BNc4-PR e BNc-1	35
2.4.1.1 Sinais clínicos e mortalidade	35
2.4.1.2 Exame citológico à fresco do cérebro	35
2.4.1.3 Exame histopatológico	35
2.4.1.4 Exame Imuno-histoquímico	35
2.4.2 Experimento 2: Distribuições e intensidade das lesões (cepa NC-1)	36
2.4.2.1 Sinais clínicos e mortalidade	36
2.4.2.2 Exame citológico à fresco do cérebro	36
2.4.2.3 Exame histopatológico	36
2.4.2.4 Exame Imuno-histoquímico	37
2.5 DISCUSSÃO	44
2.5.1 Experimento 1: Caracterização biológica das cepas BNc4-PR e BNc-1	44

2.5.2 Experimento 2: Distribuições e intensidade das lesões (cepa NC-1)	46
2.6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
3. CAPÍTULO 2. INFECÇÃO CONGENITA POR <i>Neospora caninum</i> EM CORDEIROS RECÉM-NASCIDO E NATIMORTO NO ESTADO DO PARANÁ-BRASIL	64
3.1 INTRODUÇÃO	65
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	67
3.2.1 Histórico do cordeiros	68
3.2.2 Histórico da ovelha	68
3.2.3 Exame Sorológico	68
3.2.4 Exame histopatológico	69
3.2.5 Exame Imuno-histoquímico	69
3.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	69
3.3 RESULTADOS	71
3.3.1 Exame Sorológico	71
3.3.2 Necropsia e exame histopatológico	71
3.3.3 Exame Imuno-histoquímico	71
3.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	72
3.4 DISCUSSÃO	79
3.5 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIA	82
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
5. ANEXOS	95
5.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA	96
5.2 PROTOCOLO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO	98

1. INTRODUÇÃO GERAL

A neosporose é causada por um parasito coccídeo, intracelular obrigatório, denominado *Neospora caninum*. Este protozoário, por semelhanças morfológicas, foi diagnosticado erroneamente até 1988 como *Toxoplasma gondii* (Dubey *et al.*, 1988a; Dubey, Schares e Ortega, 2007; Dubey e Schares, 2011).

Desde o primeiro reconhecimento da doença em cães (Bjerkas *et al.*, 1984) e em bovinos (Thilsted e Dubey, 1989), a neosporose está sendo descrita no mundo como uma doença grave, que acomete principalmente bovinos e cães (Dubey, Schares e Ortega, 2007).

A doença é considerada uma das principais causas de aborto em bovinos, estando relacionada a problemas de infertilidade e nascimento de bezerros natimortos ou doentes, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos em rebanhos de corte e leite (Dubey, 2003; Dubey e Schares, 2011). O cão, principal hospedeiro definitivo da doença, desenvolve quadro neuromuscular, que pode ser acompanhado por dermatite (Bjerkas *et al.*, 1984; Dubey *et al.*, 1988a; Boyd *et al.*, 2005). A neosporose é ocasionalmente diagnosticada em ovinos, caprinos, cervídeos, e em outras espécies de animais silvestres (Dubey 2003; Dubey, Schares e Ortega, 2007; Donahoe *et al.*, 2015).

Dubey *et al.* (1988b) isolaram a primeira cepa de *Neospora caninum*, conhecida como NC-1. Esta cepa foi isolada de cães e é considerada referência, sendo de fundamental importância no estudo da neosporose. Deste então, outras cepas de *N. caninum* foram isoladas em vários países, com diferenças intraespecíficas de patogenicidade, quando caracterizadas biologicamente (Yamane *et al.*, 1996; Stenlund *et al.*, 1997; Magnino *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2007; Fish *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2009; Salehi *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2014)

No Brasil, foram realizados estudos de soroprevalência para *N. caninum* em cães (Sousa *et al.*, 2012; Mascilli *et al.*, 2015), em bovinos (Locatelli- Dittrich *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2010; Oshiro *et al.*, 2007), em ovinos (Moraes *et al.*, 2011; Oshiro *et al.*, 2015), em caprinos (Moraes *et al.*, 2011; Varaschin *et al.*, 2011), em cervídeos (Tiemann *et al.*, 2005a; Tiemann *et al.*, 2005b) e em bubalinos (Silva *et al.*, 2010; Brasil *et al.*, 2015), demonstrando que os animais estão expostos a infecção pelo protozoário. Em contraposição, poucos trabalhos

confirmam a doença no país (Gondim *et al.*, 1999; Coberllini *et al.*, 2000; Coberllini *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2005; Coberllini *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2014; Malaguti *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2012; Varaschin *et al.*, 2012; Mesquita *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014), descrevendo a manifestação clínica e a detecção do parasito *N. caninum* nos tecidos dos animais doentes, o que dificulta a compreensão da real importância da neosporose no Brasil.

No Brasil, as cepas de *N. caninum* vêm sendo isoladas e caracterizadas em diferentes estados do país (Gondim *et al.*, 2001; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2003; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004; Pena *et al.*, 2007; Chryssafidis *et al.*, 2014).

O presente trabalho foi desenvolvido e dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo demonstra no encéfalo de camundongos BALB/c, a distribuição e a intensidade das lesões causadas pelo protozoário *Neospora caninum* (cepa NC-1) e aborda os sinais clínicos e as lesões histopatológicas desenvolvidas no encéfalo de camundongos BALB/c, experimentalmente infectados, com duas cepas de *N. caninum* (BNc-1 e BNc4-PR), isoladas de bovinos no estado do Paraná. O título do capítulo é: “Caracterização e distribuição das lesões por *Neospora caninum* no encéfalo de camundongos BALB/c experimentalmente infectados e caracterização biológica de isolados do Paraná”. O segundo capítulo aborda a infecção congênita de dois cordeiros com o protozoário *Neospora caninum*, demonstrando os sinais clínicos e as lesões histopatológicas desenvolvidas na espécie, pela infecção natural com o protozoário. O título do capítulo é: “Infecção congênita por *Neospora caninum* em cordeiros recém-nascido e natimorto no estado do Paraná- Brasil”.

REFERÊNCIAS

- BASSO, W.; HERRMANN, D. C.; CONRATHS, F. J.; PANTCHEV, N.; VRHOVEC, M. G.; SCHARES, G. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. **Veterinary Parasitology**. v. 159, p.162-166, 2009.
- BJERKÅS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd Journal**, v.70, p.271-274, 1984.
- BOYD, S. P.; BARR, P. A.; BROOKS, H. W.; ORR, J. P. Neosporosis in a young dog presenting with dermatitis and neuromuscular signs. **The Journal of Small Animal Practice**. v. 46, n. 2, p. 85-88, 2005.
- BRASIL, A. W.; PARENTONI, R. N.; FEITOSA, T. F.; BEZERRA, C. S.; VILELA, V. L.; PENNA, H. F.; AZEVEDO, S. S. Risk factors for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* seropositivity in buffaloes in Paraíba State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 24, n. 4, p. 459-463, 2015.
- CHRYSSAFIDIS, A.L.; CANTÓN, G.; CHIANINI, F.; INNES, E.A.; MADUREIRA, E. H.; GENNARI, S.M. Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of *Neospora caninum* in experimentally infected cows and buffaloes in early pregnancy. **Parasitology Research**. v. 113, p. 1521-1528, 2014.
- CORBELLINI L. G.; PESCADOR, C. A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN D.; SMITH, D. R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **Veterinary Journal**. v. 172, n. 1, p. 114-120, 2006.
- CORBELLINI, L G; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M. M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural** vol.30 no.5, 2000

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D; CRUZ, C.F.E.; 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, p. 195–202, 2002.

COSTA, R. C.; ORLANDO, D. R.; ABREU, C. C.; NAKAGAKI, K. Y.; MESQUITA, L. P.; NASCIMENTO, L. C.; SILVA, A. C.; MAIORKA, P. C.; PECONICK, A. P.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. **BMC Veterinary Research**. v.10, p. 291, 2014.

DONAHOE, S. L.; SCOTT A. LINDSAY, MARK KROCKENBERGER, DAVID PHALEN, JAN ŠLAPETA. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. v. 4, p. 216–238, 2015.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American 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 the American Veterinary Medical Association**. v. 193, p. 1259–1263, 1988b.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**. v.89, p. 42–46, 2003.

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

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

DUBEY, J. P.; VIANNA, M. C.; KWOK, O. C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; TUO, W.; VELMURUGAN, G. V.; CONORS, M.; JENKINS, M. C. Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v.149, p.158-166, 2007.

FISH, L.; MAZUZ, M.; MOLAD, T.; SAVITSKY, I.; SHKAP, V. Isolation of *Neospora caninum* from dairy zero grazing cattle in Israel. **Veterinary Parasitology**. v. 149, p. 167-171, 2007.

GONDIM, L.F. P.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO, L. A., HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 47, 1999.

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESUS, E. E. V; RIBEIRO, M. R.; 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 bradzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**. v.101, p.1-7, 2001.

JIA, L. J.; ZHANG, S. F.; LIU, M. M.; QIAN, N. C.; GUO, H. P. Isolation, Identification, and Pathogenicity of *Neospora caninum* China Yanbian strain. **Iranian Journal of Parasitology**. v. 9, n. 3, p. 394–401, 2014.

KIM, J. H.; SOHN, H. J.; HWANG, W. S.; HWANG, E. K.; JEAN, Y. H.; YAMANE, I.; KIM, D. Y. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. **Veterinary Parasitology**. v. 90, p. 147-154, 2000.
LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINOJOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; SOUSA, R.S.; LEITE, L.C., THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation

of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **The Veterinary Record**. v. 153, n. 12, p. 366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, ROSÁRIA REGINA T.B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R. V.; PINCKNEY, R. D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

MAGNINO, S.; VIGO, P. G.; FABBI, M.; COLOMBO, M.; BANDI, C.; GENCHI C. Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. **Veterinary Record**. v. 144, n. 16, p. 456, 1999.

MALAGUTI, J. M. A.; CABRAL, A. D.; ABDALLA, R. P.; SALGUEIRO, Y. O.; GALLETI, N. T. C.; OKUDA, L. H.; CUNHA, E. M. S.; PITUCO, E. M.; FAVA, C. D. *Neospora caninum* as causative agent of bovine encephalitis in Brazil *Neospora caninum* como agente causal de encefalite bovina no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 21, n. 1, p. 48-54, 2012.

MASCOLLI, R.; SOTO, F. R. M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H.; PINHEIRO, S. R.; GUILLOUX, A. G. A.; AZEVEDO, S. S.; SILVA, P. V.; GENNARI, S. M.; FERNANDES, A. R. F.; PENA, H. F. J.; VASCONCELLOS, S. A. Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis and neosporosis in the dog population of Ibiúna, São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 36, n. 6, p. 3777-3786, 2015.

MESQUITA L. P.; NOGUEIRA, C. I.; COSTA, R. C.; ORLANDO, D. R.; BRUHN F. R. P.; LOPES, P. F. R.; NAKAGAKI, K. R. Y.; PECONICK, A. P.; SEIXAS J. N.; BEZERRA, J. P.S.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. Antibody

kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*.

Veterinary Parasitology. v. 196, p. 327-332, 2013.

MILLER, C. M. D., QUINN, H. E.; WINDSOR, P. A; ELLIS, J. T.

Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle.

Australian Veterinary Journal. v. 80, n 10, 2002.

MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H. A.;

MACEDO, G. L. M. J; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D.

Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG

antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira**

de Parasitologia Veterinária v. 20, n. 4, p. 312-317, 2011.

OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C.; OLIVEIRA, J. M.; MONTEIRO, L. A. R. C.;

ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle

from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de**

Parasitologia Veterinária. v. 16, n. 3, p. 133-138, 2007.

OSHIRO, L. M.; REIS, F. A.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; CUNHA, R. C.;

ANDREOTTI, R. Serology for toxoplasmosis and neosporosis in ewes in the

state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Veterinary Science e**

Technology. v. 6, p. 1-5, 2015.

PENA, H. F.; SOARES, R. M.; RAGOZO, A. M.; MONTEIRO, R. M.; YAI, L.

E.; NISHI, S. M.; GENNARI, S. M. Isolation and molecular detection of

Neospora caninum from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary**

Parasitology, v. 20, n.147, p. 61-66, 2007.

PINTO A.P.; BACHA F.B.; SANTOS B.S.; DRIEMEIER D.; ANTONIASSI

N.A.B.; RIBAS N.L.K.S; LEMOS R.A.A. Sheep abortion associated with

Neospora caninum in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária**

Brasileira. v. 32, n. 8, p.739-742, 2012.

RODRIGUES, A. A. R.; 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, p. 139-150, 2004.

SALEHI, N.; HADDADZADEH, H.; SHAYAN, P.; KOOHI, M. K. Isolation of *Neospora caninum* from an aborted fetus of seropositive cattle in Iran. **Veterinarski Arhiv**. v. 82 n. 6, p. 545-553, 2012.

SANTOS, A. P. M. E.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. *Neospora caninum* in dairy cattle in Paraná State, Brazil: histological and immunohistochemical analysis in fetuses. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 26, n. 4, p. 559-562, 2005.

SANTOS, A. P. M. E.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Encefalomielite congênita em bezerro associada ao *Neospora caninum* no estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 27, n. 1, p. 111-114, 2006.

SILVA, S. P.; MOTA, R. A.; FARIA, E. B.; FERNANDES, E. F.T.S.; NETO, O. L. S.; ALBUQUERQUE, P. P.F.; DIAS, H. L.T. Anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas no estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 5, 2010.

SOUSA, M. E.; PORTO, W. J. N.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; NETO, O. L. S.; PINHEIRO, J. W. J.; MOTA, R. A. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in the state of Alagoas, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 21, n. 3, p. 287-290, 2012.

STENLUND, S.; BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J.; KINDAHL, H.; UGGLA, A. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**. v. 83, n. 3, p. 214-219, 1997.

TEIXEIRA, W. C.; UZÊDA, R. S.; GONDIM, L. F.P.; SILVA, M. I.S.; PEREIRA, H. M.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A.G. Prevalência de anticorpos anti-

Neospora caninum (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 9, p. 729-734, 2010.

THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.1, p.205-209, 1989.

TIEMANN, J. C.; RODRIGUES, A. A.; SOUZA, S. L.; DUARTE, J. M.; GENNARI, S. M. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Brazilian cervids kept in captivity. **Veterinary Parasitology**. v. 129, p. 341-343, 2005a.

TIEMANN, J. C. H.; SOUZA, S. L. P.; RODRIGUES, A. A. R.; DUARTE, J. M. B; GENNAR, S. M. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Veterinary Parasitology**. v.134, p. 73–76, 2005b.

VARASCHIN, M. S.; GUIMARÃES, A. M.; HIRSCH, C.; MESQUITA, L. P.; ABREU, C. C.; ROCHA, C. M. B. M.; WOUTERS, F.; MOREIRA, M. C. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 1, p. 53-58, 2011.

VARASCHIN, M. S.; HIRSCH, C.; WOUTERS, F.; NAKAGAKI, K. Y.; GUIMARÃES, A. M.; SANTOS, D. S.; BEZERRA, P. S. B. J; COSTA, R. C.; PECONICK, A. P.; LANGOHR, I. M. Congenital Neosporosis in Goats from the State of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**. v. 50, n. 1, p. 63-67, 2012.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. *In vitro* isolation of a bovine *Neospora* in Japan. **Veterinary Record**. v. 138, p. 652-652, 1996.

2. CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES POR *NEOSPORA CANINUM* NO ENCÉFALO DE CAMUNDONGOS BALB/C EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS DO PARANÁ

(CHARACTERIZATION AND DISTRIBUTION OF LESIONS CAUSED BY *NEOSPORA CANINUM* IN THE BRAIN OF EXPERIMENTALLY INFECTED BALB/C MICE AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ISOLATES IN PARANÁ)

RESUMO

Neospora caninum é um parasito coccídeo, intracelular, causador da neosporose. A doença é considerada uma das principais causas de aborto em bovinos e também está relacionada ao nascimento de bezerros doentes que apresentam sinais neurológicos, evoluindo à morte. Modelos experimentais com camundongos são utilizados para compreender melhor a patogênese desta doença. Os objetivos deste estudo foram realizar a caracterização biológica de duas cepas de *Neospora caninum*, a BNC-1 e BNC-4-PR, isoladas no Paraná (Brasil), utilizando camundongos BALB/c e mapear a distribuição das lesões causadas pelo *N. caninum* e sua intensidade, no cérebro de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com a cepa NC-1. Foram utilizados quarenta e cinco camundongos, separados em três grupos A (BNC4-PR), B (cepa BNC-1) e C (NC-1). Os grupos A e C foram subdivididos em animais imunossuprimidos (A1 e C1) e não imunossuprimidos (A2 e C2). Os camundongos foram inoculados com taquizoítos por via intraperitoneal, nas doses de $6 \times 10^6/\mu\text{L}$ (grupo A1), $3 \times 10^5/\mu\text{L}$ (grupo A2), $4 \times 10^6/\mu\text{L}$ (grupo B) e $2 \times 10^6/\mu\text{L}$ (grupo C1 e C2). A eutanásia dos animais foi realizada em períodos determinados e distintos para cada grupo, sendo avaliados com 30, 60, 90, 120 e 180 dias pós-inoculação. Nos encéfalos dos animais foram realizados exames citológico à fresco, histopatológico e imunohistoquímico. Na caracterização biológica das cepas isoladas no Paraná, não foram observados sinais clínicos típicos da neosporose em camundongos e não ocorreu morte espontânea devido a doença. Os cistos não foram observados nos cérebros dos animais nos exames à fresco, porém taquizoítos extracelulares foram visualizados no período de 30 e 60 dias (p.i), nos camundongos inoculados com a cepa BNC4-PR (grupo A2). Alterações histopatológicas não foram evidenciadas nos camundongos inoculados com a cepa BNC-1. Nos animais inoculados com a cepa

BNc4-PR observou-se gliose focal, discreta, no córtex frontal de camundongo inoculado com a cepa (30 dias pós inoculação). Na caracterização biológica das cepas isoladas no Paraná, verificou-se que a cepa BNc4-PR é patogênica para camundongos e causa lesão no córtex frontal de camundongos BALB/c experimentalmente infectados. Nos camundongos inoculados com a cepa referência (NC-1), verificou-se lesões histopatológicas típicas da neosporose, de intensidade decrescente de acordo com os períodos avaliados, sendo acentuada no período de 30 dias (p.i) e discreta no período de 120 dias (p.i) e mais frequentes na região do mesencéfalo, estrutura do tronco encefálico. As lesões encefálicas ocasionadas pela neosporose variam de intensidade de acordo com a evolução da doença e apresentam padrão de distribuição irregular, destacando-se a região do mesencéfalo.

Palavras-chave: neosporose; protozoário; distribuição tecidual; camundongos.

ABSTRACT

Neospora caninum is an intracellular coccidian parasite and the causative agent of neosporosis. The disease is considered to be one of the major causes of abortion in cattle and it is also associated with the birth of sick calves showing neurological signs, evolving to death. Mouse models of infectious disease are used to a better understanding of the pathogenesis of this disease. This study was aimed at performing biological characterization of two strains of *N. caninum* (BNc 4-PR and BNc-1) isolated in Parana (Brazil) using BALB/c mice and mapping the distribution of the lesions caused by *N. caninum* and their intensity in the brain of BALB/c mice experimentally infected with NC-1 strain. Forty-five mice divided into three groups: A (BNc4-PR), B (BNc-1 strain) and C (NC-1) were used in the experiment. The groups A and C were divided into immunosuppressed (A1, C1) and non-immunosuppressed (A2 and C2) animals. The mice were inoculated intraperitoneally with 6×10^6 tachyzoites/uL (group A1), 3×10^5 tachyzoites/uL (group A2), 4×10^6 tachyzoites/uL (group B) and 2×10^6 tachyzoites/uL (groups C1 and C2). Animal euthanasia was performed at determined and different times for each group, and they were evaluated on days 30, 60, 90, 120 and 180 after inoculation. Cytology without staining, histopathology and immunohistochemistry were performed on the brains of the animals. Typical clinical signs of neosporosis in mice were not observed using biological characterization of the strains isolated in Parana and no natural death was caused by the disease. Cysts of

N. caninum were not observed in the animals' brains using cytology without staining, but extracellular tachyzoites were seen from days 30 to 60 after inoculation (p.i.) in mice inoculated with BNc4-PR strain (A2 group). Histopathological changes were not evident in the mice inoculated with BNC-1 strain. In animals inoculated with BNc4-PR strain, mild and focal gliosis was observed in the frontal cortex 30 days after inoculation. In biological characterization of the strains isolated in Paraná, it was found that the BNc4-PR strain is pathogenic for mice and cause lesions in the frontal cortex of BALB/c mice experimentally infected. In mice inoculated with the reference strain (NC-1), typical histopathological lesions of neosporosis were observed, with a decrease in intensity over time, and they manifested high-intensity lesions up to 30 days p.i. and discrete in the 120-day p.i. period. The lesions were more frequently observed in the midbrain region in the brain stem structures. The intensity of brain lesions caused by neosporosis varies according to the evolution of the disease and the lesions show an uneven pattern of distribution, highlighting the midbrain region.

Keywords: neosporosis; protozoan; tissue distribution; mice.

2.1 INTRODUÇÃO

A neosporose, causada pelo parasito coccídeo intracelular *Neospora caninum*, é considerada uma das principais doenças responsáveis pela ocorrência de aborto em bovinos de várias partes do mundo, estando relacionada a problemas de infertilidade e nascimento de bezerros natimortos ou doentes, que apresentam sinais neurológicos nos primeiros dias de vida, evoluindo à morte (Andreotti, 2001; Dubey e Schares, 2006). A doença representa um sério problema econômico, pelas perdas reprodutivas e diminuição da produtividade nos rebanhos de corte e de leite (Barros *et al.*, 2011; Dubey e Schares, 2011, Reichel *et al.*, 2013).

O *N. caninum* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae (Dubey *et al.*, 1988a; Ellis *et al.*, 1994). No gênero *Neospora* estão descritas duas espécies: a *caninum* e a *hughesi* (Dubey e Lindsay, 1996).

Neospora sp tem ciclo biológico heterógeno que envolve três estágios principais: oocistos, que são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos, como o cão (McAllister *et al.*, 1998), os coiotes (Gondim, McAllister e Zemlicka, 2004), o

dingo Australiano (King *et al.*, 2010) e o lobo (Dubey *et al.*, 2011); taquizoítos e bradizoítos são estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários, que podem ser diferentes espécies de carnívoros, como a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) (Almeria *et al.*, 2002), de artiodáctilos, como os bovinos (Thilsted e Dubey, 1989) e bubalinos (*Bubalus bubalis*) (Chryssafidis *et al.*, 2015); de aves, como o galo doméstico (*Gallus domesticus*) (Costa *et al.*, 2008), de perissodáctilos, como o rinoceronte-branco (*Ceratotherium simum*) (Sommanustweechai *et al.*, 2010) e de roedores, como camundongos (*Mus musculus*) (Barrat *et al.*, 2008) e ratos (*Rattus norvegicus*) (Huang *et al.*, 2004).

O cão, hospedeiro definitivo, ingere os cistos (estágio latente) contendo bradizoítos, presentes nos tecidos da carcaça dos hospedeiros intermediários, desenvolvendo uma infecção intestinal. O parasito se reproduz de forma sexuada formando os oocistos não esporulados, que são eliminados nas fezes (McAllister *et al.*, 1998). Estes esporulam no ambiente após 24 a 72 horas e contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos. São resistentes no ambiente, permanecendo viáveis por longo período (Lindsay, Dubey e Duncan, 1999). Os oocistos esporulados são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, como o bovino, nos alimentos contaminados. No intestino os esporozoítos são liberados e infectam as células do trato intestinal, transformando-se em taquizoítos (formas de multiplicação rápida - assexuada), causando lesões teciduais e propagando a infecção para vários tecidos do hospedeiro. No interior das células neuronais (encéfalo e medula espinhal) e das fibras musculares esqueléticas, os taquizoítos também podem se transformar em bradizoítos, formando cistos (Dubey *et al.*, 1988a; Lindsay e Dubey, 1990).

Até o momento, os cistos de *N. caninum* foram observados no sistema nervoso central (SNC) e no músculo esquelético dos hospedeiros intermediários (Lindsay e Dubey, 1990; Goodswen *et al.*, 2013). Os taquizoítos, causadores da doença sintomática, foram encontrados em uma variedade de outros tecidos, mas o principal local da infecção é no SNC (Lindsay e Dubey, 1990; Lindsay *et al.*, 1995; Helman *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2009; García-Melo *et al.*, 2010; Nishimura *et al.*, 2013).

A neosporose pode ser transmitida por duas vias principais, a via horizontal, onde há a ingestão de oocistos, taquizoítos ou cistos contendo bradizoítos (Schaes e Conraths, 2001; Dijkstra *et al.*, 2001; Bandini *et al.*, 2011; Dubey e Schares, 2011) e a via vertical (transplacentária) considerada a grande responsável pela disseminação e manutenção do patógeno nos rebanhos (Barr *et al.* 1993; Björkman *et al.*, 1996;

Varaschin *et al.*, 2012; Goodswen *et al.*, 2013), entretanto há indícios de transmissões lactogênica (Uggla *et al.*, 1998; Moskwa e Cabaj, 2007) e venérea (Ortega- Mora *et al.*, 2003; Ferre *et al.*, 2005).

O diagnóstico definitivo é realizado pela detecção do parasito nos tecidos, como cérebro, medula espinhal, coração, fígado, músculo esquelético, pulmão, rim e placenta, através das técnicas de imuno-histoquímica e PCR (Barr *et al.*, 1991; Dubey e Lindsay, 1996; Pereira-Bueno *et al.*, 2003; Dubey e Schares, 2006; Pescador *et al.*, 2007; Orlando *et al.*, 2013). Métodos sorológicos como imunofluorescência indireta (IFI) e teste imunoenzimático (ELISA) podem ser realizados, porém estas técnicas apenas indicam a exposição dos animais a doença (Barr *et al.*, 1994; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2001; Dubey e Schares, 2006; Dubey, Schares e Ortega-Mora, 2007; Dubey e Schares, 2011).

O exame histopatológico também está entre os métodos mais utilizados no diagnóstico da doença. No encéfalo, principal órgão afetado, observa-se alterações típicas da neosporose, que consiste em infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e histiocitário, associado a focos de necrose, proliferação de células microgliais e formação de manguitos perivasculares (Barr *et al.*, 1994; Helman *et al.*, 1998; Pescador *et al.*, 2007; García-Melo *et al.*, 2010; Orlando *et al.*, 2013).

A exposição à neosporose é alta e a doença está amplamente difundida pelo mundo, com prevalências que diferem entre países e também entre gados de leite e de corte (Sanderson, Gay e Baszler, 2000; Vural *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Eiras *et al.*, 2011; Nematollahi, Jaafari, e Moghaddam, 2011). As variações são devido a existência de diversos fatores de risco e profilaxia adotada em cada região (Dubey e Schares, 2011; Goodswen *et al.*, 2013).

No Brasil a prevalência para *N. caninum* em bovinos difere entre os estados (Gondim *et al.*, 1999; Coberllini *et al.*, 2002; Ragozo *et al.*, 2003; Sartor *et al.*, 2005; García-Melo *et al.*, 2006; Munhoz *et al.*, 2006; Oshiro *et al.*, 2007; Minervino *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2010), assim como em ovinos e caprinos (Figliuolo *et al.*, 2004 a; Figliuolo *et al.*, 2004b; Vogel, Arenhart e Bauermann, 2006; Moraes *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2011; Varaschin *et al.*, 2011; Oshiro *et al.*, 2015). No Paraná, Locatelli-Dittrich *et al.* (2001) detectaram por teste imunoenzimático (ELISA) anticorpos anti-*N.caninum* em 34,8% do rebanho leiteiro da região de Campos Gerais, localizado no centro oriental paranaense. Ogawa *et al.* (2005), observaram em vacas leiteiras do norte do estado soroprevalência de 12% para *Neospora caninum* e Guimarães *et al.*

(2004) analisando vinte e três fazendas da mesma região, verificaram que 14,3% das vacas, a maioria com mais de 24 meses de idade, eram soropositivos para neosporose. No sudoeste do estado, Camillo *et al.* (2010) detectaram soroprevalência da doença em 24,2% dos bovinos leiteiros, demonstrando que os bovinos do estado estão expostos a neosporose.

Em vários países diferentes tipos de cepas de *N. caninum* foram identificadas (Barber *et al.*, 1993; Yamane *et al.*, 1996; Stenlund *et al.*, 1997; Magnino *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2007; Fish *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2009; Salehi *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2014). Os estudos de caracterização biológica das cepas demonstraram que há diferenças quanto a virulência, intensidade das lesões, mortalidade e morbidade dos isolados (Miller *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2009; Regidor-Cerrillo *et al.* 2010; Al-Qassab, Reichel e Ellis, 2010; King *et al.*, 2011).

García-Melo *et al.* (2010), evidenciaram diferenças significativas entre a patogenicidade de cepas distintas de *N. caninum*, isoladas de 14 bezerros oriundos de sete rebanhos leiteiros de diferentes regiões da Espanha (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008). Neste estudo, utilizando como modelo experimental o camundongo BALB/c e separando as fases da infecção em aguda e crônica, os autores observaram que a carga parasitária de determinadas cepas no sangue e no fígado de cada animal variou de acordo com o tempo de evolução da infecção e com o tecido analisado. A intensidade das lesões microscópicas visualizadas nos tecidos (encéfalo, coração, fígado e pulmão), variaram de acordo com a cepa e a fase da doença. Demonstrando que há uma diversidade na patogenicidade intra-espécie dos isolados de *N. caninum*.

Diferentes tipos de cepas de *N. caninum* vêm sendo isoladas e caracterizadas no Brasil, (Gondim *et al.*, 2001; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2003; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004; Chryssafidis *et al.*, 2014).

Garcia-Melo *et al.* (2009), verificaram que em camundongos infectados com a cepa NC-Goiás, a carga parasitaria média diária observada no encéfalo foi menor, quando comparada com a média apresentada pelas cepas NC-Liverpool e NC-1, demonstrando que a cepa NC-Goiás é menos patogênica quando comparada as cepas descritas.

A cepa NC-1 (primeiro isolado de *N. caninum*) foi isolada em 1988, nos Estados Unidos, de cães filhotes que apresentaram paresia dos membros posteriores com cinco a oito semanas de vida, evidenciando predominantemente polirradiculoneurite e polimiosite granulomatosa. Neste mesmo estudo, os taquizoítos

isolados *in vitro*, foram inoculados em cão. Na necropsia verificou-se hemorragia pulmonar e fígado friável, com áreas pálidas, evidenciando na microscopia necrose de coagulação multifocal, associadas a inúmeros taquizoítos (Dubey et al., 1988b). Na sequência, muitos estudos com a cepa foram realizados, estabelecendo modelos experimentais suscetíveis a doença clínica (Lindsay et al., 1995; Collantes-Fernández et al., 2004), para melhor compreensão da patogenia da doença (Cole et al., 1995; López-Pérez et al., 2008), para comparação da patogenicidade entre as cepas (Lindsay e Dubey, 1990; Garcia-Melo et al., 2009; Chryssafidis et al., 2014) e para a descoberta de tratamentos e vacinas (Debache et al., 2009; Penarete-Vargas et al., 2010). Contudo, há poucos estudos que descrevem a distribuição e intensidade das lesões causadas pela cepa NC-1 (referencia) no sistema nervoso dos animais (Nishimura et al., 2013; Nishimura et al., 2015), considerando-se que o tecido encefálico é o principal local da infecção. O órgão não é afetado de maneira uniforme e o conhecimento dos locais das lesões, contribuiria para o diagnóstico, auxiliando na coleta de amostras e na melhor compreensão da patogênese da doença e da persistência do parasito neste tecido.

Os objetivos do estudo foram:

2.2 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização biológica, avaliando em diferentes períodos, o encéfalo de camundongos BALB/c inoculados com duas cepas de *Neospora caninum*, a BNC-1 e BNC-4-PR, isoladas de bovinos no Paraná (Brasil) (experimento 1) e mapear a distribuição e a intensidade das lesões causadas pelo *N. caninum* (cepa NC-1) em camundongos BALB/c experimentalmente infectados (experimento 2).

2.2.1 Objetivos específicos

- estabelecer a patogenicidade das cepas de *N. caninum* BNC-1 e BNC4-PR, isoladas no Paraná, em camundongos BALB/c, avaliando os sinais clínicos, as lesões encefálicas e a presença de parasitos em diferentes períodos, e comparar com a cepa NC-1 (controle) (experimento 1).

- determinar a região de maior prevalência das lesões e a presença de taquizoítos no SNC de camundongos inoculados com a cepa NC-1, por exames histopatológico e imuno-histoquímico, verificando se há variação entre a intensidade

das lesões e a presença de taquizóitos no SNC, em relação ao tempo de infecção (experimento 2).

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná sob o número de Protocolo SCA-UFPR-048/2014 (Anexo 5.1). O estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (Curitiba – Brasil).

2.3.1 Cepas do parasito

A cepa NC-1 e as cepas de *N. caninum* isoladas de fetos bovinos no Paraná (BNc-1 e BNc4-PR), foram fornecidas pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

2.3.2 Cultivo de células Vero

As células Vero, linhagem de células de rim de macaco africano, foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em banho-maria, na temperatura de 37°C, para cultivo em garrafas de cultura celular, mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C, utilizando meio de crescimento Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM Sigma) com pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2ml/L de penicilina G potássica, 2 ml/L de sulfato de estreptomicina e 0,25 ml/L de anfotericina B. Por microscopia invertida, observou-se a adesão e confluência das células, para formação da monocamada celular, para realização da passagem ou subcultivo das células, formando assim um banco de células Vero. Para replicação dos protozoários, foram utilizadas garrafas com monocamadas de células Vero com 24 horas de cultivo.

2.3.3 Cultivo das cepas NC-1, BNc-1 e BNc4-PR

As cepas foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas e cultivadas em garrafas de cultura celular contendo monocamada de células Vero (ATCC CCL 81), utilizando meio de crescimento Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM Sigma), suplementado com soro fetal bovino a 2% (SFB) e solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina – 1 mL/L) e antimicóticos (anfotericina - 0,25 ml/L), e foram mantidas a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂. O meio das garrafas foi substituído

duas vezes por semana, transferindo o parasito para novas garrafas contendo células vero.

Os taquizoítos de cada cepa, foram coletados das garrafas de cultura, em tubo Falcon (50 mL) estéril; as garrafas foram selecionadas pela quantidade de taquizoítos soltos no meio extracelular, visualizados após leitura no microscópio invertido. O material foi centrifugado e o precipitado diluído em 1 mL de solução salina tamponada (PBS). Para obtenção da concentração final de protozoário por camundongo, os taquizoítos foram contados em câmara de Neubauer.

2.3.4. Delineamento experimental *in vivo*

No estudo foram utilizados quarenta e cinco (45) camundongos BALB/c (linhagem de camundongos isogênicos), livres de patógenos (SPF), fêmeas, com quatro semanas de idade, obtidos do mesmo fornecedor (Biotério Central da FMUSP). Os animais foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e permaneceram duas semanas em quarentena. O ambiente era controlado e os animais foram alojados em gaiola de plástico, recebendo a mesma alimentação (ração para roedor) e água *ad libitum*.

Os camundongos foram separados em três grupos, de acordo com o tipo de cepa inoculada (BNc-1, BNc4-PR e NC-1), e os grupos das cepas BNc4-PR e NC-1 foram divididos em dois subgrupos, dos imunossuprimidos e não imunossuprimidos (tabela 1). Para inoculação, os taquizoítos foram diluídos em solução salina e injetados por via intraperitoneal.

Tabela1. Grupos de camundongos por cepa, dose inoculada de *N. caninum* e realização ou não de imunossupressão.

Cepas	Grupos	Número de camundongos	Dose inoculada	Imunossupressão
BNc4-PR	A1	10	$6 \times 10^6 / \mu\text{L}$	Sim
	A2	11	$3 \times 10^5 / \mu\text{L}$	Não
BNc-1	B	09	$4 \times 10^6 / \mu\text{L}$	Não
NC-1	C1	06	$2 \times 10^6 / \mu\text{L}$	Sim
	C2	09	$2 \times 10^6 / \mu\text{L}$	Não

A imunossupressão foi realizada com a administração de acetato de metilprednisolona, por via intramuscular no membro posterior direito, com dose inicial de 2,0mg aplicada sete dias antes da inoculação e de 2,5mg no dia da infecção experimental (Collantes-Fernández *et al.*, 2004). Após três semanas da inoculação, a imunossupressão foi mantida através da administração de 10 µg/ml de dexametasona na água dos animais por uma semana (Canada *et al.*, 2002).

As eutanásias foram realizadas em períodos determinados, definidos como 30, 60, 90, 120 e 180 dias pós-inoculação (p.i.), que diferiram entre as cepas (tabela 2). Os camundongos foram monitorados diariamente e examinados para verificar os sinais clínicos descritos da doença nesta espécie, que consiste em pelos ásperos, apatia, anorexia, “head tilting”, andar em círculos, ataxia, fraqueza nos membros pélvicos e paralisia, manifestados antes do quinto dia pós-inoculação (EPERON *et al.*, 1999; Lindsay *et al.*, 1995).

O método de escolha para eutanásia foi o deslocamento da cervical, após anestesia inalatória com isoflurano (3-4%) em câmara de indução para roedores (Monteiro *et al.*, 2010). Realizou-se a necropsia dos camundongos e o encéfalo foi coletado para o exame citológico à fresco e para o exame histopatológico.

2.3.5 Exame citológico à fresco do encéfalo

Após a remoção do encéfalo, uma amostra do lado esquerdo do lobo frontal foi selecionada para avaliação do tecido à fresco por microscopia de luz, utilizando a técnica de *imprint* (duplicata). Neste exame, pesquisou-se a presença de cistos e taquizoítos livres no tecido. A quantidade de taquizoítos visualizados nas amostras foi classificada em:

- discreta: < 20 taquizoítos livres / campo (100x)
- moderada: 20 – 50 taquizoítos livres / campo (100x)
- acentuada: > 50 taquizoítos livres / campo (100x)

As leituras das lâminas dos encéfalos de todos os animais foram realizadas por dois observadores.

2.3.6 Exame histopatológico

O cérebro foi fixado em formol 10% tamponado, por 24 horas. Na sequência, foi clivado em oito cortes sequências (sentido coronal) de 0,3cm de espessura por

cassete e permaneceu no formol 10% tamponado por mais 24 horas. O material foi incluído em parafina e secções de 4µm foram realizadas para confecção de uma lâmina por cassete, seguida da coloração com hematoxilina e eosina (H&E).

As avaliações em microscopia óptica foram realizadas no telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo de todos os camundongos por dois observadores. Todas as lesões observadas foram descritas qualitativamente e quantitativamente.

A intensidade das lesões foi classificada em discreta, moderada e acentuada, de acordo com o número de células inflamatórias mononucleares e células da glia, visualizadas nos focos de gliose (40x):

- discreta: < 200 células / foco de gliose
- moderada: 200 - 400 células / foco de gliose
- acentuada: > 400 células / foco de gliose

2.3.7 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada nos oito cortes sequencias dos encéfalos dos camundongos com lesões histopatológicas. Os exames imuno-histoquímicos foram processados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG).

Para a realização da técnica utilizou-se o anticorpo primário anti-*Neospora caninum* (VRMD, USA), o anticorpo secundário anti-cabra biotinilado e o complexo estreptavidina-peroxidase (kit LSAB, Dako) (Varaschin *et al.*, 2012). A técnica imuno-histoquímica está descrita no Anexo 5.2.

Tabela 2. Período das eutanásias após inoculação dos camundongos com as cepas BNc4-PR, BNc-1 e NC-1 de *N. caninum*

PERÍODO EUTANÁSIA (dias)	NÚMERO DE CAMUNDONGOS/ CEPA DE <i>Neospora caninum</i>				
	BNc4-PR (grupo A1)	BNc4-PR (grupo A2)	BNc-1 (grupo B)	NC-1 (grupo C1)	NC-1 (grupo C2)
30	3	2	—	2	3
60	3	3	3	2	3
90	2	—	—	—	—
120	2	3	3	2	3
180	—	3	3	—	—
Total	10	11	9	6	9

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Experimento 1: Caracterização biológica das cepas BNc4-PR e BNc-1

2.4.1.1 Sinais clínicos e mortalidade

Os camundongos inoculados com a cepa BNc-1 e os inoculados com a cepa BNc4-PR (grupos A1 e A2) não apresentaram sintomatologia clínica compatível com neosporose ou morte espontânea.

2.4.1.2 Exame citológico à fresco do cérebro

No exame à fresco do cérebro dos camundongos do grupo A2, observou-se moderada quantidade de parasitos livres no período de 30 dias (p.i) e discreta quantidade ou nenhum taquizoítos foram visualizados nos períodos de 60,120 e 180 dias (p.i) (Tabela 3).

No grupo A1, verificou-se no cérebro dos três animais avaliados no período de 30 dias (p.i) e em um dos camundongos avaliados no período de 60 dias (p.i) (camundongo 5), uma discreta quantidade de taquizoítos livres. Porém nas amostras cerebrais dos demais animais do grupo, não foram observados taquizoítos.

No grupo B, observou-se uma discreta quantidade de taquizoítos livres, em um dos camundongos avaliados no período de 60 dias (p.i) (camundongo 3), porém nos demais períodos, nenhum taquizoíto foi observado.

Cistos teciduais não foram visualizados no cérebro dos camundongos inoculados com as cepas BNc4-PR e BNc-1.

2.4.1.3 Necropsia e exame histopatológico

Nenhuma alteração macroscópica foi observada nos cérebros dos camundongos inoculados com as cepas BNc4-PR e BNc-1 e não foram evidenciadas alterações histopatológicas no encéfalo dos camundongos do grupo B (cepa BNc-1) e do grupo A1 (cepa BNc4-PR).

Em um camundongo dos onze avaliados no grupo A2 visualizou-se no lobo frontal direito do cérebro, gliose focal, discreta (Figura 1), no período de 30 dias (p.i) (tabela 3).

2.4.1.4 Exame Imuno-histoquímico

O resultado da técnica imuno-histoquímica, realizada na amostra encefálica do camundongo do grupo A2 que apresentou lesão histopatológica, foi negativo.

2.4.2 Experimento 2: Distribuição e intensidade das lesões (cepa NC-1)

2.4.2.1 Sinais clínicos e mortalidade

Não houve caso de morte espontânea nos animais inoculados com a cepa NC-1 e os camundongos do grupo C1 não evidenciaram sinais clínicos da doença.

Três camundongos do grupo C2 apresentaram sinais clínicos em períodos diferentes. Um camundongo desenvolveu a sintomatologia com 28 dias p.i., outro com 30 dias p.i. e o terceiro camundongo com 90 dias p.i. (Tabela 4). Nos três camundongos os sinais clínicos foram apatia e anorexia. Sinais neurológicos, como “head tilt” e andar em círculos, foram visualizados nos animais que manifestaram a doença com 30 e 90 dias p.i.

2.4.2.2 Exame citológico à fresco do cérebro

No exame à fresco do cérebro dos camundongos do grupo C2, uma acentuada quantidade de taquizoítos foi observada com 30 dias (p.i.). Com 60 dias (p.i) foi evidenciada moderada quantidade de parasitos livres e uma discreta quantidade de taquizoítos foi visualizada no cérebro de um dos três camundongos avaliados no período de 120 dias (p.i) (Tabela 4).

No exame citológico à fresco dos animais do grupo C1, verificou-se no cérebro dos camundongos avaliados no período de 30 dias (p.i), assim como em um dos animais avaliados no período de 60 dias (p.i) (camundongo 3), uma discreta quantidade de taquizoítos livres na amostra. No cérebro dos demais animais do grupo, taquizoítos não foram observados.

E cistos teciduais não foram visualizados no cérebro dos animais inoculados com a cepa NC-1 (Grupo C1 e C2).

2.4.2.3 Necropsia e exame histopatológico

Não foram visualizadas alterações macroscópicas no encéfalo dos camundongos inoculados com a cepa NC-1 (grupo C1 e C2) e alterações histopatológicas não foram evidenciadas no encéfalo dos camundongos do grupo C1 (camundongos imunossuprimidos).

Dos nove animais do grupo C2 (imunocompetentes), sete apresentaram lesões encefálicas microscópicas, que variaram de intensidade e de localização, quando comparadas entre os períodos.

A região com maior frequência de lesões foi o mesencéfalo, na região do núcleo rubro, localizado posteriormente a substância negra (85,71% = 6/7), seguida

pelo metencéfalo, no tegmento da ponte (57,14% = 4/7), telencéfalo, no córtex do lobo frontal (42,85% = 3/7) e na região do corpo estriado, mais especificamente na região de núcleo lentiforme (42,85% = 3/7), e diencéfalo, no tálamo (28,58% = 2/7). Nenhum animal evidenciou lesões microscópicas no mielencéfalo (bulbo) (Tabela 4).

O exame histopatológico evidenciou alterações típicas da neosporose (Figura 2). Observou-se gliose, que variou de acentuada, no período de 30 dias, a discreta no período de 120 dias, associada a presença de manguitos perivasculares linfoplasmocitários, que variaram de acentuados a discretos e a presença de estruturas fusiformes nucleadas, organizadas em pequenos grupos (sugestivo de taquizoítos de *N. caninum*), que foram observados apenas no período de 30 dias. Em todos os períodos houve necrose, contudo nos períodos de 30 e 60 dias, as áreas de necrose apresentavam-se circunscritas por infiltrado inflamatório mononuclear e células da glia e no período de 120 dias, observou-se focos de necrose mineralizados. Os resultados das alterações histopatológicas observadas em cada região, por camundongo, estão apresentadas na tabela 5.

2.4.2.4 Exame Imuno-histoquímico

No exame imuno-histoquímico foi confirmada a presença de taquizoítos de *N. caninum* no encéfalo dos camundongos imunocompetentes inoculados com a cepa NC-1 (camundongos 1, 2 e 4 - Grupo C2), no período de 30 e 60 dias (p.i). Os taquizoítos estavam localizados próximo as áreas de gliose, em grupos ou isolados (Figura 3), nas regiões de núcleo rubro (mesencéfalo) e no tegmento da ponte (metencéfalo).

Tabela 3. Sinais clínicos e resultados dos exames citológico à fresco e histopatológico do grupo A2 (cepa BNc4-PR).

Períodos	Camundongos	Sinais Clínicos ^o	Exame citológico (Quantidade de taquizoítos)	Lesões histopatológicas	Localização no SNC
30 dias	1	–	Moderada	Gliose focal, discreta	Lobo frontal direito
	2	–	Discreta	–	–
60 dias	3	–	Discreta	–	–
	4	–	Discreta	–	–
	5	–	–	–	–
120 dias	6	–	–	–	–
	7	–	–	–	–
	8	–	–	–	–
180 dias	9	–	–	–	–
	10	–	–	–	–
	11	–	–	–	–

^o – : ausência de sinais clínicos, de lesões histopatológicas e de taquizoítos.

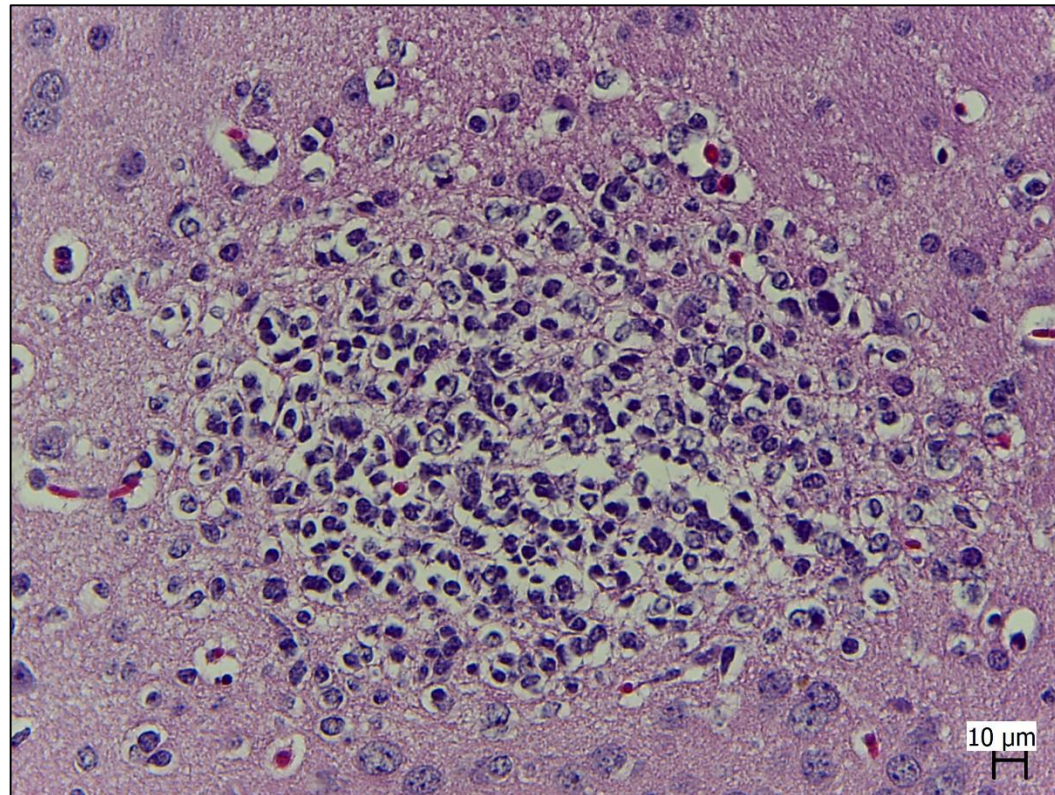


Figura 1. Gliose focal, discreta no cérebro de camundongo do grupo A2 inoculado com a cepa BNC4-PR de *N. caninum*, 30 dias (p.i). H&E. Barra: 10μm.

Tabela 4. Sinais clínicos, exames citológicos à fresco e histopatológicos dos camundongos (grupo C2) inoculados com a cepa NC-1 de *N. caninum*

Período	Camundongos	Sinais Clínicos*	Exame citológico (Quantidade de taquizoítos)	Lesões histopatológicas	Localização no SNC
30 dias	1	*	Acentuada	*	Dc; Mtc; Mlc
	2	*	Acentuada	*	Tc; Mc;
	3	–	Acentuada	*	Tc; Mc; Mtc
60 dias	4	–	Moderada	*	Tc, Mc
	5	–	Moderada	*	Mc
	6	–	–	–	
120 dias	7	*	Discreta	*	Mlc
	8	–	–	–	
	9	–	–	*	Tc

*: presença de sinais clínicos e de lesões histopatológicas; – : ausência de sinais clínicos, de taquizoítos e de lesões histopatológicas.
Tc: telencéfalo; Dc: diencéfalo; Mc: mesencéfalo; Mtc: metencéfalo; Mlc: Mielencéfalo.

Tabela 5. Alterações histopatológicas no encéfalo de camundongos inoculados com a cepa NC-1 (grupo C2), nos períodos de 30, 60 e 120 dias pós-infecção.

Regiões do SNC		Alterações encontradas por camundongo ^a								
		30 dias			60 dias			120 dias		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
TELENCÉFALO	Córtex-lobo frontal	*	G ₂ , M ₂ , N ₂	G ₁ , M ₂	*	*	*	*	*	G ₃
	Núcleo lentiforme	*	G ₁ , M ₁ , N ₁	*	G ₂ , M ₂	*	*	*	*	N _m
DIENCÉFALO	Tálamo	G ₂ , M ₃	*	*	M ₃	*	*	*	*	*
MESENCÉFALO	Núcleo rubro	G ₁ , M ₁ , , N ₁	G ₁ , M ₂ , , N ₂	M ₃	G ₂ , M ₂ , N ₁	M ₃	*	M ₃	*	*
METENCÉFALO	Ponte	G ₂ , M ₁	*	G ₁ , M ₂	M ₃	*	*	N _m	*	*
MIELENCÉFALO	Bulbo	*	*	*	*	*	*	*	*	*

^a G₁: Gliose acentuada; G₂: Gliose moderada; G₃: Gliose discreta. M₁: Manguito perivascular linfoplasmocitário, acentuado; M₂: Manguito perivascular linfoplasmocitário, moderado. M₃: Manguito perivascular linfoplasmocitário, discreto. N₁: Necrose focalmente extensa; N₂: Necrose focal; N_m: Necrose focal, com focos de mineralização; *:sem alterações.

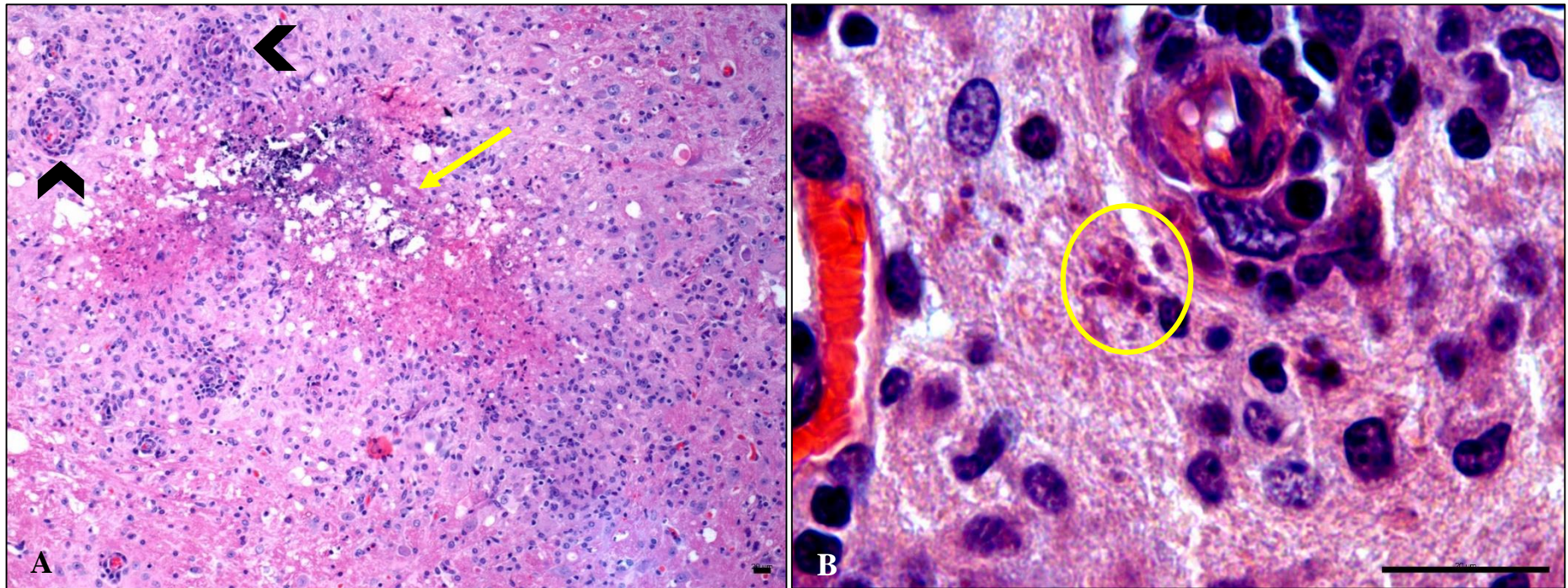


Figura 2. Encefalo de camundongos BALB/c inoculados com a cepa NC-1 de *Neospora caninum*. **(A)** necrose focalmente extensa (seta amarela) circunscrita por moderada quantidade de infiltrado inflamatório mononuclear e células da glia, acompanhada por mangitos perivascularres linfoplasmocitários (cabeça da seta). H&E. Barra: 20 μ m. **(B)** Observa-se estruturas de formato fusiforme, em grupo, contendo núcleo, compatível com taquizoítos de *N. caninum*, visualizados no período de 30 dias (p.i). H&E. Barra: 200 μ m.

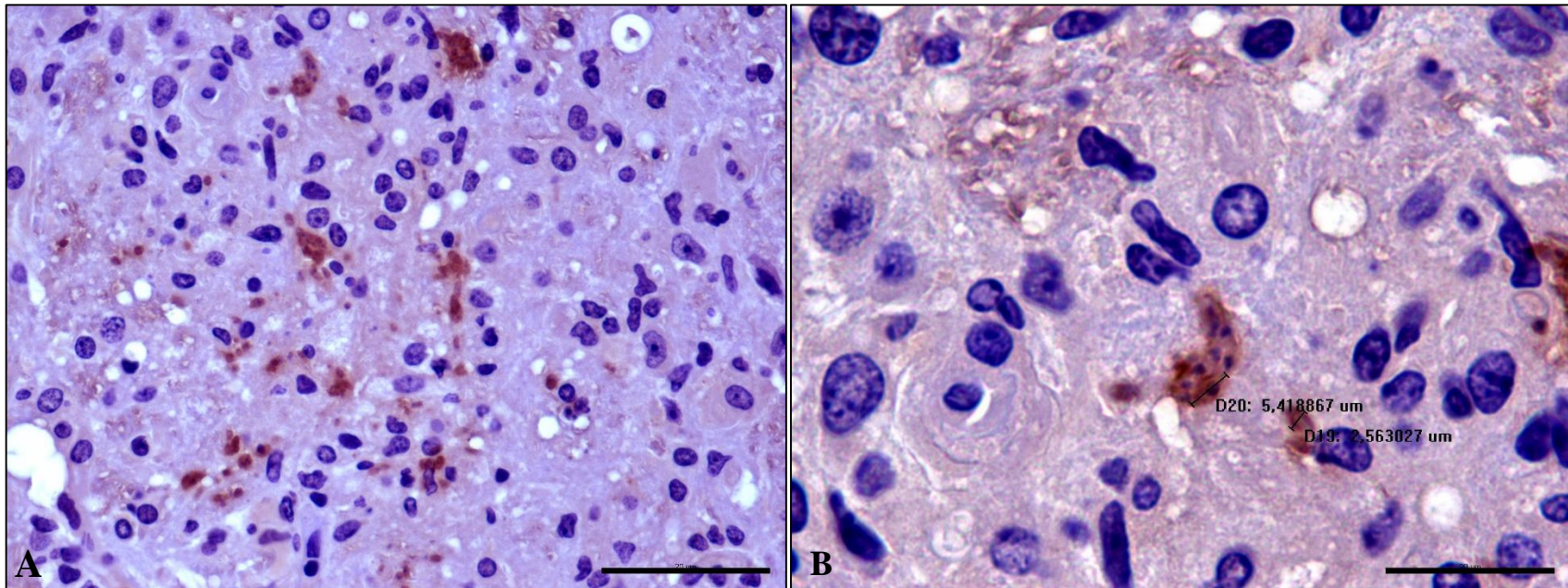


Figura 3. Imuno-histoquímica positiva para *Neospora caninum* em encéfalo de camundongo BALB/c inoculado com a cepa NC-1, 30 dias (p.i). **(A)** Observa-se marcação acentuada dos tachizoítos de *N. caninum*. Método estreptavidina-biotina-peroxidase. DAB. Barra: 20 μ m. **(B)** Tachizoítos medindo 5,4 x 2,6 μ m, organizados em pequenos grupos ou isolados. Método estreptavidina-biotina-peroxidase. DAB. Barra: 200 μ m.

2.5 DISCUSSÃO

2.5.1 Experimento 1: Caracterização biológica das cepas BNc4-PR e BNc-1

A cepa BNc4-PR causa encefalite não supurativa focal, discreta, no lobo frontal de camundongos BALB/c não imunossuprimidos (grupo A2), no período de 30 dias (p.i.). Após 30 dias de inoculação, não foram observadas alterações histopatológicas no cérebro de nenhum dos animais inoculados com a cepa. Modelos experimentais com camundongos são muito utilizados de maneira ampla no estudo da neosporose (Cole *et al.*, 1995; Lindsay *et al.*, 1995; Long, Baszler e Mathison, 1998; Eperon *et al.*, 1999; Baszler, Mcelwain e Mathison, 2000; Quinn *et al.*, 2002; Collantes-Fernández *et al.*, 2004; López-Pérez *et al.*, 2008; Debache *et al.*, 2009; Penarete-Vargas *et al.*, 2010; Salehi *et al.*, 2012). Em diversos países, incluindo o Brasil, há relatos da caracterização biológica de isolados de *N. caninum* em camundongos (Lindsay e Dubey, 1990; McGuire *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2002; Garcia-Melo *et al.*, 2009; Rojo-Montejo *et al.*, 2009; Garcia-Melo *et al.*, 2010), demonstrando que esta espécie é suscetível a infecção pelo parasito.

Neste trabalho, comparando os resultados das cepas BNc4-PR (grupo A2) e da cepa NC-1 (controle), observou-se que no período de 30 dias (p.i), um dos animais inoculados com a cepa BNc4-PR apresentou lesão discreta e focal, no lobo frontal direito e que no mesmo período, três camundongos inoculados com a cepa NC-1 evidenciaram lesão acentuada e extensa, com áreas de necrose, nas regiões de telencéfalo, mesencéfalo e metencéfalo, verificando que a cepa controle (NC-1 – isolado de cão) é mais patogênica que a cepa BNc4-PR (isolado de bovino). Miller *et al.* (2002), descreveram a caracterização biológica do primeiro isolado de *Neospora caninum* de origem bovina da Austrália, em estudo comparativo entre a cepa recém isolada NC-Nowra e a cepa NC-Liverpool. As cepas foram inoculadas em camundongos BALB/c e observaram que a cepa NC-Liverpool (isolado de cão) causou acentuada encefalite não supurativa, quando comparada com a cepa NC-Nowra (isolado bovino), que ocasionou encefalite não supurativa discreta a moderada, resultado similar ao observado neste estudo, demonstrando que a virulência das cepas isoladas de hospedeiros intermediários (bovino) é menor quando equiparada a virulência das cepas isoladas de hospedeiros definitivos (cão), resultado também observado por Atkinson *et al.*, 1999, Quinn *et al.*, 2002 e Garcia-Melo *et al.*, 2009; Rojo-Montejo *et al.*, 2009.

A cepa BNc-1 (isolado bovino) é menos patogênica que o isolado BNc4-PR (origem bovina). Isto foi evidenciado pela ausência de lesões no encéfalo dos nove animais inoculados com a cepa BNc-1. Resultado semelhante ao analisado por Garcia-Melo et al. (2010), que evidenciaram diferenças de patogenicidade entre isolados de origem bovina, inoculando em camundongos BALB/c cepas de *N. caninum* distintas, obtidas de vacas congenitamente infectadas, mas saudáveis. Nos camundongos experimentalmente infectados com as cepas Nc-Spain 5H, Nc-Spain 7 e Nc-Spain 9, foram evidenciadas lesões mais acentuadas no encéfalo, quando comparadas com os camundongos infectados com os isolados Nc-Spain 2H, Nc-Spain 3H e Nc-Spain 6.

Neste experimento verificou-se, comparando as cepas BNc-1 e BNc4-PR, que não houve relação entre a dose inoculada e a presença de lesão no encéfalo por *N. caninum*, porque a dose administrada da cepa BNc4-PR no grupo A2, foi inferior a dose inoculada da cepa BNc-1 e somente foi evidenciada lesão no cérebro do camundongo do grupo A2. Diferente dos resultados analisados por Collantes-Fernández et al. (2004) que relataram associação entre a dose inoculada e a presença de lesões, indicando que quanto maior a dose utilizada de taquizoitos de *N. caninum*, maior a chance de ocorrer lesões no encéfalo dos animais, assim como o observado por Long, Bazler e Mathison (1998) e Gottstein et al. (2001).

Os resultados dos exames citológicos à fresco e histopatológicos dos encéfalos dos camundongos inoculados com a cepa BNc4-PR, foram análogos quando equiparados ao tempo de infecção da doença. No período de 30 dias, observou-se moderada quantidade de taquizoitos livres no cérebro do camundongo que apresentou gliose focal, discreta. A quantidade de taquizoitos livres no cérebro dos camundongos diminuiu de acordo com a evolução da doença e lesões histopatológicas não foram observadas. A relação entre a presença de alterações histopatológicas no encéfalo e a quantidade de taquizoitos, em diferentes períodos, está associada a resposta imunológica do hospedeiro, uma vez que as células inflamatórias presentes na lesão, tem a função de combater o protozoário (Nishimura et al., 2013; Nishimura et al., 2015).

A cepa BNc4-PR causou encefalite não supurativa em camundongo neste estudo, mas em nenhum dos animais inoculados, incluindo os camundongos do grupo B (cepa BNc-1) foi verificado a formação de cistos nas secções avaliadas e nos períodos avaliados. Algumas cepas apresentam maior capacidade de formar cistos,

sendo uma característica intrínseca de alguns isolados (McGuire et al., 1997; Collantes-Fernández et al., 2004; Locatelli-Dittrich et al., 2004; King et al., 2011). Portanto, há diferenças de patogenicidade entre as cepas isoladas de *N. caninum* (Kang et al., 2009; Al-Qassab, Reichel e Ellis, 2010; García-Melo et al., 2010; King et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Miller; Chryssafidis et al., 2014), o que enfatiza a necessidade de considerar e estudar a influência das diversidades intra-espécies dos isolados.

Não foram visualizadas lesões compatíveis com neosporose nos encéfalos dos camundongos do grupo A1, diferente dos resultados obtidos no grupo A2, apesar de todos os animais serem inoculados com a mesma cepa. Neste estudo, para inoculação dos camundongos, a cepa BNC4-PR foi cultivada *in vitro* e cada grupo foi inoculado com taquizoítos de passagens diferentes. Devido ao maior tempo em cultivo celular, os taquizoítos inoculados nos camundongos do grupo A1 poderiam apresentar menor virulência do que os inoculados no grupo A2, pois há relação entre a virulência do parasito *N. caninum* e o tempo de cultivo *in vitro*. Bartley et al. (2006), demonstraram que quanto maior o número de passagens dos taquizoítos de *N. caninum* no cultivo celular, menor a virulência apresentada pelo parasito quando inoculado em camundongos BALB/c.

2.5.2 Experimento 2: Distribuição e intensidade das lesões (cepa NC-1)

Neste experimento, dos nove camundongos do grupo C2, sete apresentaram lesões microscópicas, apesar de todos serem inoculados com a mesma quantidade de taquizoítos (2×10^6). Long, Baszler e Mathison (1998), Gottstein et al. (2001) e Collantes-Fernández et al. (2004), descreveram que há relação entre a dose inoculada e a frequência de lesões, demonstrando que quanto maior a dose, maior a quantidade de alterações visualizadas. Porém Lindsay et al. (1995) em estudo experimental com camundongos BALB/c experimentalmente inoculados com a cepa NC-1, utilizaram a dose de 2×10^5 , quantidade de taquizoítos inferior a realizada neste trabalho e todos os camundongos avaliados desenvolveram lesões no cérebro, assim como Nishimura et al. (2015) que utilizou a dose de 1×10^6 e todos os camundongos inoculados desenvolveram encefalite.

Os sete animais que apresentaram alterações histopatológicas, demonstraram um padrão de distribuição irregular das lesões, sendo mais frequentes no cérebro do que no cerebelo, resultado similar ao observado por Helman et al. (1998) e Nishimura

et al. (2013), em fetos bovinos naturalmente infectados e bezerros experimentalmente infectados, respectivamente.

Neste estudo verificou-se que a região mais frequentemente afetada em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com a cepa NC-1, na dose de $2 \times 10^6/\mu\text{L}$, foi o mesencéfalo, estrutura que integra o tronco encefálico, mais especificamente na substância cinzenta própria do segmento (núcleo rubro), que se localiza em porções mais profundas do tecido. Diferente dos resultados obtidos por Nishimura *et al.* (2015), na mesma espécie, onde as lesões histopatológicas foram significativamente mais frequentes no telencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo de camundongos sintomáticos, e por Helman *et al.*, 1998 e Nishimura *et al.*, 2013, nos bovinos, onde as alterações histopatológicas foram mais observadas no telencéfalo e diencéfalo, em porções mais superficiais que profundas da substância cinzenta.

O resultado indica que a distribuição das lesões causadas por *N. caninum*, pode variar de acordo com a espécie do hospedeiro. Adicionalmente, é desconhecido se os resultados podem ser extrapolados para as demais raças de camundongos, uma vez que a doença ocorre de maneira distinta entre esses animais (Lindsay e Dubey, 1990; Lindsay *et al.*, 1995; Long, Baszler e Mathison, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2004), o que pode estar relacionado a capacidade imunológica de cada raça (Long, Baszler e Mathison, 1998). Portanto, mais estudos são necessários para caracterizar a distribuição e intensidade das lesões causadas pela neosporose em camundongos e nas demais espécies de animais.

De acordo com os períodos avaliados, verificou-se variação na intensidade das lesões e na presença de taquizoítos nos camundongos do grupo C2. Na fase aguda da infecção (30 dias p.i), a gliose era predominantemente extensa e acentuada, com taquizoítos evidentes (exame histopatológico e imuno-histoquímica) e em grande quantidade. Conforme a evolução da doença (período de 60 e 120 dias p.i) a intensidade da gliose decresceu e havia menor quantidade ou nenhum taquizoíto nas áreas avaliadas. Nishimura *et al.* (2013) observaram que a reação celular inflamatória, associada a gliose, alterações típicas da neosporose, ocorrem na resposta imunológica do hospedeiro ao protozoário no tecido, o que poderia justificar a relação da intensidade das lesões e a presença de taquizoítos, nos períodos avaliados.

Cistos teciduais não foram observados nos nove animais do grupo C2. Há diferenças na capacidade de formação de cistos entre as cepas de *N. caninum*, tendo a cepa NC-1 uma baixa capacidade de formar cistos, quando comparada, por

exemplo, a cepa NC-Liverpool (McGuire et al., 1997; Collantes-Fernández *et al.*, 2004).

No presente estudo, três dos nove animais imunocompetentes inoculados com a cepa NC-1 (grupo C2), desenvolveram sinais clínicos e nenhum camundongo morreu após a inoculação com protozoário na dose de $2 \times 10^6/\mu\text{L}$, apesar de casos de óbitos serem frequentemente descritos nesta raça de camundongo, mesmo quando doses similares ou mais baixas à inoculada neste trabalho, são utilizadas (Lindsay *et al.*, 1995; Long, Baszler e Mathison, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2015). Os animais apresentaram sinais clínicos com 28, 30 e 90 dias (p.i.). Outros trabalhos (Lindsay e Dubey, 1990; Lindsay et al., 1995; Long, Baszler e Mathison, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2004) demonstraram que a manifestação clínica da neosporose pode variar de 5 a 60 dias (p.i.).

Os camundongos imunossuprimidos do grupo C1 não apresentaram sinais clínicos e alterações histopatológicas no encéfalo. A diferença dos resultados obtidos no grupo C1 e no grupo C2, podem ser devido ao tempo de cultivo da cepa, pois os taquizoítos inoculados nos camundongos do grupo C1, permaneceram em cultivo celular por mais tempo do que os inoculados no grupo C2, sendo de passagens diferentes e há estudo que relata a possibilidade da virulência da cepa NC-1 *in vivo*, ser atenuada pelo tempo de cultivo *in vitro* (Bartley *et al.*, 2006).

2.6 CONCLUSÃO

A cepa BNc4-PR causa encefalite no lobo frontal de camundongos BALB/c experimentalmente infectados, porém sinais clínicos não foram observados e não houve a formação de cistos nos períodos avaliados. Esta cepa é menos patogênica quando comparada a cepa NC-1 (controle) nesta espécie.

A cepa BNc-1 é menos patogênica que o isolado BNc4-PR e o isolado NC-1 (controle), pois não foram evidenciadas lesões histopatológicas, assim como a presença de cistos, no encéfalo dos camundongos infectados com a cepa.

As lesões encefálicas ocasionadas pela cepa NC-1 variam de intensidade quando comparadas entre os períodos de 30, 60 e 120 dias (p.i.), estando associada a presença de taquizoítos no tecido e apresentam padrão de distribuição irregular, com lesões mais frequentes na região do mesencéfalo.

REFERÊNCIAS

ALMERÍA S.; FERRER, D.; PABÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S.

Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*.

Veterinary Parasitology. v. 107, n. 4, p. 287-294, 2002.

AL-QASSAB, S. E.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. **Diversity**. v.2, p. 411-438, 2010.

ANDREOTTI, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino. **Documentos 104**. Campo-Grande: Embrapa Gado de Corte-CNPGC, 14p. 2001.

ATKINSON, R.; HARPER, P. A.; RYCE, C.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**. v. 118, p. 363-370, 1999.

BANDINI, L. A.; NETO, A. F. A.; PENA, H. F. J.; CAVALCANTE, G. T.; SCHARES, G.; NISHI, S. M.; GENNARI, S. M. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v.176, p.151–156, 2011.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990–1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 202, p.113–117, 1993.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; DUBEY, J. P.; ANDERSON, M. L. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 3, p. 39-46, 1991.

BARR, B. C.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; BONDURANT, R. H.; ARDANS, A. 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.

BARRATT, J.; AL QASSAB, S.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**. v. 22, p. 228–233, 2008.

BARROS, J. C.; NETO, L. F. F.; FAGUNDES, M. B. B.; ANDREOTTI, R. Economic assesment of neosporosis in beef cattle system performance with different technological levels. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 32, p. 1943-1954, 2011.

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.

BASSO, W.; HERRMANN, D. C.; CONRATHS, F. J.; PANTCHEV, N.; VRHOVEC, M. G.; SCHARES, G. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. **Veterinary Parasitology**. v. 159, p.162-166, 2009.

BASZLER, T. V.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 7, p. 893- 899, 2000.

BJORKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 208, p. 1441-1444, 1996.

CAMILLO, G.; CADORE, G.; CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; BRÄUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.62, n.6, p.1511-1513, 2010.

CANADA, N.; MEIRELES, C. S.; ROCHA, A.; SOUSA, S.; THOMPSON G.; DUBEY, J.P.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; COSTA, J. M. C. First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 110, p. 11–15, 2002.

CHRYSSAFIDIS, A. L.; CANTÓN, G.; CHIANINI, F.; INNES, E. A.; MADUREIRA E. D. H.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. Abortion and foetal lesions induced by *Neospora caninum* in experimentally infected water buffalos (*Bubalus bubalis*). **Parasitology Research**. v. 114, p. 193-199, 2015.

CHRYSSAFIDIS, A.L.; CANTÓN, G.; CHIANINI, F.; INNES, E.A.; MADUREIRA, E. H.; GENNARI, S.M. Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of *Neospora caninum* in experimentally infected cows and buffaloes in early pregnancy. **Parasitology Research**. v. 113, p. 1521-1528, 2014.

COLE, R. A; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L; DUBEY, J. P. Vertical Transmission of *Neospora caninum* in Mice. **The Journal of Parasitology**. v. 81, n. 5, p. 730-732, 1995.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PÉREZ-PÉREZ, V.; PEREIRA-BUENO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. **Journal of Parasitology**. v. 90, p. 579-583, 2004.

CORBELLINI L. G. A; DRIEMEIER, D. A.; CRUZ, C. F. E.; GONDIM, A. L. F. P.; WALDA, B. V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 103, p. 195–202, 2002.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; ARAÚJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 38, p. 157–159, 2008.

DEBACHE, K.; ALAEDDINE, F.; GUIONAUD, C.; MONNEY, T.; MÜLLER, J.; STROHBUSCH, M.; LEIB, S, L.; GRANDGIRARD, D.; HEMPHILL, A. Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**. v. 39, p.1373–1384, 2009.

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

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American 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 the American Veterinary Medical Association**. v. 193, p. 1259–1263, 1988b.

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.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 67, p. 1-5, 1996.

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

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

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

DUBEY, J. P.; VIANNA, M. C.; KWOK, O. C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; TUO, W.; VELMURUGAN, G. V.; CONORS, M.; JENKINS, M. C. Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v.149, p.158-166, 2007.

EIRAS, C.; ARNAIZ, I. ; ÁLVAREZ-GARCÍA, G. ; ORTEGA-MORA, L. M. ; SANJUÁN, M. L. ; YUS, E. ; DIÉGUEZ, 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.

ELLIS, J. T.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A.; JOHNSON, A. M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, p. 303-311, 1994.

EPERON, S.; BRÖNNIMANN, K.; HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (mMT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**. v. 21, p. 225-236, 1999.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**. v. 63, n 5, p. 1504-1518, 2005.

FIGLIUOLO, L. P. C., KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.123, p. 161–166, 2004a.

FIGLIUOLO, L. P. C.; RODRIGUES, A. A. R.; VIANA, R. B.; AGUIAR, D. M.; KASAI, N.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**. v. 55, p. 29–32, 2004b.

FISH, L.; MAZUZ, M.; MOLAD, T.; SAVITSKY, I.; SHKAP, V. Isolation of *Neospora caninum* from dairy zero grazing cattle in Israel. **Veterinary Parasitology**. v. 149, p. 167-171, 2007.

GARCÍA-MELO, D. P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. A.; AGUADO-MARTÍNEZ, I.; DEL POZO, E.; MINGUIJÓ N.; GÓMEZ-BAUTISTA M.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. **Parasitology**. v. 137, p. 1057-1068, 2010.

GARCÍA-MELO, D. P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; DE OLIVEIRA, V. S. F.; DE OLIVEIRA, M. A. P.; SILVA, A. C. Isolation and biological characterisation of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. **Acta Parasitologica**. v. 54, p. 180-185, 2009.

GARCÍA-MELO, D. P.; SILVA, A. C.; ORTEGA-MORA, L. M.; BASTOS, S. A.; BOAVENTURA, C. M. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.15, p. 105–109, 2006.

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

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESUS, E. E. V; RIBEIRO, M. R.; 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 bradzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**. v.101, p.1-7, 2001.

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

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**. v.13, p.133–150, 2013.

GOTTSTEIN, B.; EPERON, S.; DAI, W. J.; CANNAS, A.; HEMPHILL, A.; GREIF, G. Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. **Parasitology Research**. v. 870, p. 43–48, 2001.

GUIMARÃES, J.S.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 124, p. 1–8, 2004.

HELMAN, R. G.; STAIR, E. L.; LEHENBAUER, T. W.; RODGERS, S.; SALIKI, J. T. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 10, p. 292–295, 1998.

HUANG, C. C.; YANG, C. H; WATANABE, Y.; LIAO, Y. K.; OOI, H. K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**. v. 35, n. 3, p. 283-290, 2004.

JIA, L. J.; ZHANG, S.; LIU, M.; QIAN, N.; GUO, H. Isolation, Identification, and Pathogenicity of *Neospora caninum* China Yanbian strain. **Iranian Journal of Parasitology**. v. 9, n. 3, p. 394–401, 2014.

KANG, S. W.; PARK, S. S.; CHOE, S. E. ; JEAN, Y. H.; JUNG, S. C.; KIM, K. ; QUYEN, D. V. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. **Parasitology Research**. v.104, p. 1261–1268, 2009.

KIM, J. H.; SOHN, H. J.; HWANG, W. S.; HWANG, E. K.; JEAN, Y. H.; YAMANE, I.; KIM, D. Y. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. **Veterinary Parasitology**. v. 90, p.147-154, 2000.

KING, J. S.; MCALLAN, B.; SPIELMAN, D. S.; LINDSAY, S. A; HOFMANNOVÁ, L. H.; HARTIGAN, A.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; ŠLAPETA, J. Extensive production of *Neospora caninum* tissue cysts in a carnivorous marsupial succumbing to experimental neosporosis. **Veterinary Research**. p. 42-75, 2011.

KING, J. S.; SLAPETA, J. J. 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.

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

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (protozoa: apicomplexa). **Journal of Parasitology**. v. 76, n. 3, p. 410-413, 1990.

LINDSAY, D. S.; LENZ, S. D.; COLE, R. A.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infection. **Journal of Parasitology**. v.81, p. 313–315, 1995.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R. R. T. B.; JOINEAU, M. E. G.; PINCKNEY, R. D.; SOUSA, R. S.; LEITE, L. C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. **Veterinary Record**. v. 153, p. 366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **The Journal of parasitology**. v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R. V.; PINCKNEY, R. D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

LONG, M. T.; BASZLER, T. V.; MATHISON, B. A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**. v. 84, n. 2, p. 316-320, 1998.

LÓPEZ-PÉREZ, I. C.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; AGUADO-MARTÍNEZ A.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development. **Veterinary Parasitology**. v. 155, p. 175–183, 2008.

MAGNINO, S.; VIGO, P. G.; FABBI, M.; COLOMBO, M.; BANDI, C.; GENCHI, C. Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. **Veterinary Record**. v. 144, p. 456, 1999.

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

McGUIRE, A. M.; McALLISTER, M. M.; JOLLEY, W. R.; ANDERSON- SPRECHER, R. C. A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. **Journal of Parasitology**. v. 8, p. 647–651, 1997.

MILLER, C. M. D.; QUINN, H. E.; WINDSOR, P. A.; ELLIS, J. T. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. **Australian Veterinary Journal**. v. 80, n 10, 2002.

MINERVINO, A. H. H.; RAGOZO, A. M. A.; MONTEIRO, R. M.; ORTOLANI, E. L.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**. v. 84, p. 254–256, 2008.

MONTEIRO, B. S.; CARLO, R. J.; NETO, N. M. A.; BONFÁ, L. P.; VILORIA, M. V.; NEVES, C. D.; CARVALHO, P. H.; BRITO, A. F. S. Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos. **Ciência Rural**. v. 40, n. 7, p. 1590-1596, 2010.

MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H. A.; MACEDO, G. L. J.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, n. 4, p. 312-317, 2011.

MOSKWA, B.; CABAJ, W. The role of the colostrum and milk in *Neospora caninum* transmission. **Helminthologia**. v. 44, p. 26-129, 2007.

MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T.; ALMEIDA, C. R. R.; LOPES, C. W. G. Distribuição de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras dos municípios de Resende e Rio Claro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 15, p. 101–104, 2006.

NEMATOLLAHI A.; JAAFARI, R.; MOGHADDAM, GH. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Tabriz, Northwest Iran. **Iranian Journal of Parasitology**. v. 6, n. 4, p. 95–98. 2011.

NISHIMURA, M.; KOHARA, J.; HIASA, J.; MUROI, Y.; YOKOYAM, N.; KIDA, K.; XUAN, X., FURUOKA, H.; NISHIKAWA, Y. Tissue Distribution of *Neospora caninum*

in experimentally infected cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 20, n. 2, p. 309-312, 2013.

NISHIMURA, M.; TANAKA, S.; IHARA, F.; MUROI, Y.; YAMAGISHI, J.; FURUOKA, H.; SUZUKI, Y.; NISHIKAWA, Y. Transcriptome and histopathological changes in mouse brain infected with *Neospora caninum*. **Scientific Reports**. v. 21, n. 5, p. 7936, 2015.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, p. 312–316, 2005.

ORLANDO, D. R.; COSTA, R. C.; SOARES, B. A.; OLIVEIRA, N. S. C.; NASCIMENTO, L. C.; PECONICK, A. P.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n.11, 2013.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO, S. A.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**. v. 117, n. 4, p. 301-308, 2003.

OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C.; OLIVEIRA, J. M.; MONTEIRO, L. A. R. C.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 16, n. 3, p. 133-138, 2007.

OSHIRO, L. M.; REIS, F. A.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; CUNHA, R. C.; ANDREOTTI, R. Serology for toxoplasmosis and neosporosis in ewes in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Veterinary Science & Technology**. v. 6, p. 1-5. 2015.

PENARETE-VARGAS, D. M.; MÉVÉLEC, M. N.; DION, S.; SÉCHE, E.; DIMIER-POISSON, I.; FANDEUR, T. Protection against lethal *Neospora caninum* Infection in

mice induced by heterologous vaccination with a *mic1 mic3* knockout *Toxoplasma gondii* strain. **Infection and Immunity**. p. 651– 660, 2010.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; OTEGA-MORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**. v. 111, p. 143-152, 2003.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; Oliveira, E. C.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**. v.150, p. 159-163, 2007.

QUINN, H. E.; MILLER, C. M.; RYCE, C.; WINDSOR, P. A.; ELLIS, J. T. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. **Journal of Parasitology**. v. 88, p. 691-696, 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 procedentes de seis estados Brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 12, p. 33–37, 2003.

REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; PEREIRA-BUENO, J.; ADURIZ, G.; NAVARRO-LOZANO, V.; RISCO-CASTILLO, V.; FERNANDEZ-GARCIA, A.; PEDRAZA-DIAZ, S.; ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. **Parasitology**. v. 135, p. 1651–1659, 2008.

REGIDOR-CERRILLO, J.; PEDRAZA-DIAZ, S.; ROJO-MONTEJOA, S.; VAZQUEZ-MORENOA, E.; ARNAIZB, I.; GOMEZ-BAUTISTAA, M.; JIMENEZ-PALACIOSC, S.; ORTEGA-MORAA, L.M.; COLLANTES-FERNANDEZ, E. *Neospora caninum* infection in stray and farm dogs: seroepidemiological study and oocyst shedding. **Veterinary Parasitology**. v. 174, p. 332-335, 2010.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, M. A.; GONDIM, L. F.P.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**. v. 43, p. 133–142, 2013.

RODRIGUES, A. A. R.; 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, p. 139-150, 2004.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO J.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; MARUGAN-HERNÁNDEZ, V.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; BLANCO-MURCIA, J.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**. v. 159, n. 1, p. 7-16, 2009.

ROSSI G.F.; CABRALB, D. D.; RIBEIROA, D. P.; PAJUABAA, A. C. A. M.; CORRÊAB, R. R.; MOREIRAC, R. Q.; MINEOA, T. W. P.; MINEOA, J. R.; SILVA, D. A. O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil, by diferente serological methods. **Veterinary Parasitology**. v.175, p. 252–259, 2011.

SALEHI, N.; HADDADZADEH, H.; SHAYAN, P.; KOOHI, M. K. Isolation of *Neospora caninum* from an aborted fetus of seropositive cattle in Iran. **Veterinarski Arhiv**. v. 82, n. 6, p. 545-553, 2012.

SANDERSON, M. W.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**. v. 90, p. 15–24, 2000.

SARTOR, I. F.; FILHO, A. G.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; DAL PAI, V.; SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 72, p. 413–418, 2005.

SCHARES, G.; CONRATHS, F. J. Placentophagia – an alternative way for horizontal transmission of *Neospora caninum* in cattle? **Trends in Parasitology**. v. 17, p. 574, 2001.

SOMMANUSTWEECHAI, A.; VONGPAKORN, M.; KASANTIKUL, T.; TAEWNEAN, J.; SIRIAROONRAT, B.; BUSH, M.; PIRARAT, N. Systemic neosporosis in a white rhinoceros. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 41, n. 1, p. 165-168, 2010.

STENLUND, S.; BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J.; KINDAHL, H.; UGGLA, A. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**. v. 83, n. 3, p. 214-219, 1997.

TEIXEIRA, W. C.; UZÊDA, R. S.; GONDIM, L. F. P.; SILVA, M. I. S.; PEREIRA, H. M.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 9, p. 729-734, 2010.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, p. 205-209, 1989.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; JAKUBEK, E. B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**. v. 28, n. 9, p. 1467-1472, 1998.

VARASCHIN, M. S.; GUIMARÃES, A. M.; HIRSCH, C.; MESQUITA, L. P.; ABREU, C. C.; ROCHA, C. M. B. M.; WOUTERS, F.; MOREIRA, M. C. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 1, p. 53-58, 2011.

VARASCHIN, M. S.; HIRSCH, C.; WOUTERS, F.; NAKAGAKI, K. Y.; GUIMARÃES, A. M.; SANTOS, D. S.; BZERRA, P. S. J.; COSTA, R. C.; PECONICK, A. P.;

LANGOHR, I. M. Congenital Neosporosis in Goats from the State of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**. v. 50, n. 1, p. 63-67, 2012.

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

VURAL, G.; AKSOY, E.; BOZKIR, M.; KUÇUKAYAN, U.; ERTURK, A. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle herds in Central Anatolia, Turkey. **Veterinarski arhiv**. v. 76, n. 4, p. 343-349, 2006.

WANG, C.; WANG, Y.; ZOU, X.; ZHAI, Y.; GAO, J.; HOU, M.; ZHU, X. Q. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in northeastern China. **The Journal of Parasitology**. v. 96, n. 2, p. 451- 452. 2010.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P. A. *In vitro* isolation of a bovine *Neospora* in Japan. **Veterinary Record**. v. 138, p. 652-652, 1996.

CAPÍTULO 2. INFECÇÃO CONGENITA POR *Neospora caninum* EM CORDEIROS RECÉM-NASCIDO E NATIMORTO NO ESTADO DO PARANÁ-BRASIL

(CONGENITAL *Neospora caninum* INFECTION IN NEWBORN AND STILLBORN LAMBS IN THE STATE OF PARANÁ- BRAZIL)

RESUMO

Nos sistemas de produção animal, a rentabilidade da atividade está associada a eficiência reprodutiva do rebanho. As doenças reprodutivas em ovinos podem ser causadas por agentes infecciosos, como *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Campylobacter* spp., *Chlamydophila abortus*, *Brucella ovis* e *Listeria monocytogenes*. A infecção natural por *N. caninum* em ovinos é pouco diagnosticada. O principal sinal clínico da neosporose em ovelhas é o abortamento, que pode ocorrer entre 65 e 90 dias de gestação. Os casos de nascimento de cordeiros doentes e de natimortos são pouco descritos. O objetivo do estudo foi relatar a neosporose congênita em dois cordeiros, um natimorto e um recém-nascido doente. Os cordeiros nasceram de gestações diferentes, de uma ovelha da raça Suffolk soropositiva para *N. caninum*. Nos cordeiros foram observadas lesões histopatológicas compatíveis com a doença, no sistema nervoso central. No cordeiro recém-nascido doente evidenciou-se no lobo frontal encefalite não supurativa focal, discreta. No encéfalo do cordeiro natimorto, observou-se manguitos perivasculares linfoplasmocitários e no citoplasma dos neurônios foram observados cistos com marcação positiva na imuno-histoquímica para *N. caninum*. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada nas amostras encefálicas dos dois cordeiros, para detecção de *N. caninum* (*primers* Np6 e Np21) e *T. gondii* (*primers* TOX4 e TOX5). A PCR foi positiva para *N. caninum* e negativa para *T. gondii* nos dois cordeiros. Os exames histopatológico, imuno-histoquímico e PCR confirmaram a ocorrência de infecção congênita por *N. caninum* nos cordeiros natimorto e recém-nascido doente.

Palavras-chave: neosporose; ovelha; infecção transplacentária; problemas reprodutivos.

ABSTRACT

In the animal production field, the profitability of the activity is associated with the reproductive efficiency of the herd. Reproductive disorders in sheep may be caused by infectious agents such as *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Campylobacter* spp., *Chlamydophila abortus*, *Brucella ovis* and *Listeria monocytogenes*. Natural infection of sheep with *N. caninum* is underdiagnosed. The major clinical sign of neosporosis in sheep is abortion, which can occur between days 65 and 90 of gestation. Cases of stillbirth or birth of weak lambs have been rarely reported. The aim of this study was to report congenital *N. caninum* infection in two lambs, i.e., a stillborn lamb and the birth of a weak lamb. The lambs were born from different pregnancies of a Suffolk ewe seropositive to *N. caninum*. Histopathological lesions compatible with the disease were observed in the central nervous system of the lambs. The weak newborn lamb showed mild and focal non-suppurative encephalitis in the frontal lobe. Lymphoplasmacytic perivascular cuffs were observed in the brain of the stillborn lamb and cysts stained positively by IHC for *N. caninum* were observed in the cytoplasm of the stillborn lamb's neurons. Polymerase chain reaction (PCR) was performed on the brain samples of the two lambs to detect *N. caninum* (primers Np6 and Np21) and *T. gondii* (primers TOX4 and TOX5). PCR result was positive for *N. caninum* and negative for *T. gondii* in the two lambs. The infection with *N. caninum* was confirmed in the stillborn lamb and in the weak newborn lamb by histopathology, immunohistochemistry and PCR.

Keywords: neosporosis; sheep; transplacental infection; reproductive disorders.

2.1 INTRODUÇÃO

A maior criação de pequenos ruminantes da América Latina, está no Brasil (FAO, 2013). Há 17 milhões de ovinos no país (FAO, 2013), concentrando-se em grande parte nas regiões nordeste (56,5%) e sul (30,0%), seguidas das regiões centro-oeste (5,5%), sudeste (4,2%) e norte (3,8%) (IBGE, 2013).

A rentabilidade dos sistemas de produção animal está diretamente associada a eficiência reprodutiva do rebanho, portanto distúrbios reprodutivos podem gerar perdas econômicas importantes (Ribeiro, Gregory e Mattos, 2002; Vogel, Arenhart e Bauermann, 2006).

Em ovinos, os casos de aborto, natimortos e de cordeiros recém-nascidos doentes, podem estar relacionados a agentes infecciosos como o *Toxoplasma gondii* (Edwards e Dubey, 2013; Gabardo *et al.*, 2013), *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1990; West *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2012), *Campylobacter* spp. (Gressler *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014), *Chlamydophila abortus* (Silva, Freitas e Müller, 2006; Farias *et al.*, 2013; Ebadi, Moosakhani, Jamshidian, 2015), *Brucella ovis* (Alves *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013; Wareth *et al.*, 2015) e *Listeria monocytogenes* (Rissi *et al.*, 2010; Shoukat *et al.*, 2014).

O protozoário coccídeo *Neospora caninum* é parasito intracelular obrigatório, pertence à família Sarcocystidae, e é fenotipicamente e filogenicamente semelhante ao *Toxoplasma gondii* (Sasani *et al.*, 2013). Os hospedeiros definitivos do *N. caninum* são os cães (McAllister *et al.*, 1998), os coiotes (Gondim, McAllister e Zemlicka, 2004), o dingo australiano (King *et al.*, 2010) e os lobos (Dubey *et al.*, 2011). Os bovinos, ovinos e caprinos são hospedeiros intermediários (Dubey e Schares, 2006; Dubey e Schares, 2011; Howe *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2012; Sasani *et al.*, 2013).

O primeiro caso de neosporose em ovino foi descrito por Dubey em um rebanho de ovelhas, na Inglaterra (Dubey *et al.*, 1990). Os cistos de *N. caninum* foram observados no sistema nervoso central (SNC) de cordeiro recém-nascido doente (uma semana de idade), por microscopia eletrônica e imuno-histoquímica. Desde então, estudos demonstrando a infecção experimental (Dubey e Lindsay *et al.*, 1990; McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1997; Jolley *et al.*, 1999; O'Handley *et al.*, 2002; Syed-Hussain *et al.*, 2013; Syed-Hussain *et al.*, 2015) e estudos relatando a infecção natural de ovelhas com o parasito *N. caninum* (Kobayashi *et al.*, 2001; Koyama *et al.*, 2001; Hässig *et al.*, 2003; West *et al.*, 2006; Howe *et al.*, 2008; Bishop *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2011; Howe *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012; Sasani *et al.*, 2013), estão sendo realizados para melhor compreensão da doença na espécie.

As ovelhas infectadas podem desenvolver sintomatologia semelhante a observada em bovinos. O principal sinal clínico é o abortamento, que ocorre entre 65 e 90 dias de gestação (McAllister *et al.*, 1996; Weston *et al.*, 2009), além disso os fetos podem morrer no útero e serem reabsorvidos ou mumificados (McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1997; Buxton *et al.*, 1998) e pode ocorrer, ainda que pouco relatado (Dubey *et al.*, 1990; González-Warleta *et al.*, 2014), o nascimento de cordeiros fracos e doentes com sinais neurológicos da doença.

Os relatos de soroprevalência para *Neospora caninum* em ovelhas são descritos em vários países (Gharekhani, Tavoosidana e Zandieh, 2013; Hecker *et al.*, 2013; Castañeda-Hernández, Cruz-Vázquez, Medina-Esparza, 2014;), como no Paquistão, com soroprevalência de 27,7% (Nasir *et al.*, 2012), em Granada, na América Central, onde a soroprevalência foi de 13% (Sharma *et al.*, 2015) e na Grécia, com soroprevalência de 16,8% (Anastasia *et al.*, 2013).

No Brasil, a soroprevalência para *N. caninum* em ovinos é descrita nos estados de São Paulo (Figliuolo *et al.*, 2004; Langoni *et al.*, 2011), Paraná (Romanelli *et al.*, 2007; Munhóz *et al.*, 2010), Santa Catarina (Rosa *et al.*, 2011), Rio Grande do Sul (Vogel, Arenhart e Bauermann, 2006), Mato Grosso do Sul (Oshiro *et al.*, 2015), Maranhão (Moraes *et al.*, 2011), Bahia (Rocha *et al.*, 2014) e Tocantins (Guimarães *et al.*, 2015), sendo que a menor prevalência para *N. caninum* do país foi relatada no estado do Rio grande do Norte (1,8%), em Mossoró (Soares *et al.*, 2009) e a maior foi descrita no estado de Pernambuco (64,2%), no município de Ibimirim (Tembue *et al.*, 2011), demonstrando que os ovinos do país estão expostos a doença.

Pena *et al.* (2007) descreveram no estado de São Paulo, o isolamento e a detecção do DNA de *N. caninum* de amostras encefálicas oriundas de duas ovelhas soropositivas para *N. caninum*, assintomáticas, com quatro meses de idade. No entanto, a real importância econômica, clínica e epidemiológica da doença em ovinos no Brasil é incerta, uma vez que a manifestação clínica da neosporose na espécie é pouco descrita no país. Pinto *et al.* (2012), em uma propriedade no Mato Grosso do Sul, estado do país que evidenciou soroprevalência elevada (52,2%) para *N. caninum* (Oshiro *et al.*, 2015), investigaram a ocorrência de neosporose em um rebanho de ovelhas com problemas reprodutivos. Neste estudo, quatro fetos foram avaliados, sendo que três nasceram da mesma mãe. Dois fetos apresentaram lesões histopatológicas típicas da neosporose no sistema nervoso central e no coração, evidenciando por exame imuno-histoquímico, cistos de *N. caninum*.

Esse estudo tem o objetivo de relatar dois casos de infecção natural por *N. caninum*, em cordeiros natimorto e recém-nascido doente, nascidos de gestações distintas, da mesma ovelha soropositiva para o protozoário, em rebanho do estado do Paraná, Brasil.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Histórico dos cordeiros

Em uma propriedade localizada na região metropolitana de Curitiba, nasceu de uma ovelha da raça Suffolk, no ano de 2014, um cordeiro fraco (cordeiro 1), que no sexto dia de vida manifestou sinal neurológico (convulsão). O animal apresentou dificuldade para mamar e devido as suas condições (quadro convulsivo), optou-se pela eutanásia. Na necropsia do cordeiro as amostras do pulmão, coração, fígado, rins, baço e cérebro (porções do córtex do lobo frontal, hipocampo e cerebelo) foram coletadas para exame histopatológico. Foram encaminhadas amostras encefálicas para exame imunohistoquímico (região de córtex - lobo frontal e hipocampo) e para reação em cadeia da polimerase (PCR) (porções do mesencéfalo, vermis e cerebelo).

Em 2015, nasceu da mesma ovelha, um cordeiro natimorto (cordeiro 2). Na necropsia foram coletadas amostras de sangue para exame sorológico específico para anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T gondii* e de órgãos, como pulmão, coração, fígado, rins, baço e cérebro (porções do córtex do lobo frontal, hipocampo e cerebelo) para exame histopatológico. As amostras do encéfalo foram encaminhadas para exame imunohistoquímico (região de hipocampo e cerebelo) e PCR (porções do mesencéfalo, vermis e cerebelo).

3.2.2 Histórico da ovelha

A ovelha da raça suffolk, mãe dos cordeiros 1 e 2, é procedente de um rebanho ovino de 95 animais. Foram colhidas amostras de sangue da mãe no quinto e décimo quinto dias após o parto dos cordeiros 1 e 2, para a realização de exame sorológico para *N. caninum* e *T. gondii*, sendo realizado nos anos de 2014 e 2015.

No rebanho, mais nove ovelhas apresentaram entre 2014 e 2015 problemas reprodutivos como aborto e nascimento de cordeiros natimorto e doente. Devido aos distúrbios reprodutivos observados foram coletadas amostras de sangue das nove ovelhas, após a manifestação clínica, para a realização de exame sorológico para *N. caninum* e *T gondii*.

3.2.3 Exame Sorológico

O método sorológico realizado foi a técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detectar os anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*.

As amostras de sangue do cordeiro 2, da ovelha mãe dos cordeiros e das nove ovelhas com problemas reprodutivos, foram coletadas em tubo sem

anticoagulante e após a coagulação, foram centrifugadas a 3.745 g em centrífuga Sigma® (modelo 3K30) para obtenção dos soros. Os soros foram avaliados em lâminas de RIFI com taquizoítos da cepa NC-1 (*N. caninum*) e da cepa RH (*T. gondii*), produzidos *in vitro* no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (Curitiba – PR).

Para a realização da técnica, utilizou-se o conjugado anti-igG ovino (SIGMA®) na diluição 1:100. As amostras de soro foram diluídas em PBS e o ponto de corte foi a diluição de 1:50, sendo que as amostras positivas foram tituladas. Soros controles, positivo e negativo, foram utilizados em cada lâmina, considerando positivas as amostras com fluorescência periférica total dos taquizoítos (Paré *et al.*, 1995; Dubey e Lindsay, 1996).

3.2.4 Exame histopatológico

As amostras teciduais coletadas na necropsia foram fixadas em formol 10% tamponado por 48 horas. Em seguida foram clivadas e processadas para exame histológico de rotina. As secções de 4,0µm foram realizadas para confecção de lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina (H&E), para visualização em microscopia de luz.

3.2.5 Exame Imuno-histoquímico

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do protozoário *N. caninum*, utilizou-se o anticorpo primário anti-*N. caninum* (VRMD, USA), diluído a 1:2200, o anticorpo secundário anti-cabra biotilado e o complexo estreptavidina-peroxidase (kit LSAB, Dako). Para visualização e revelação da reação utilizou-se o cromógeno DAB (“DAB Substrate Pack, Concentrated” - BIOGENEX, USA) (Varaschin *et al.*, 2012). A técnica de imuno-histoquímica está descrita no anexo 5.2.

A imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG).

3.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a amplificação das sequências de DNA genômico no tecido encefálico dos cordeiros. Os alvos da PCR foram as sequências Nc5 do genoma do *N. caninum*, de 328 pb (Yamage *et al.*, 1996)

e a região não-codificante de 529 pb, repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii* (Homan *et al.*, 2000).

As amostras do encéfalo dos cordeiros foram armazenadas em microtubos à - 20°C. A extração do DNA do tecido encefálico foi realizada com o Kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®). As amostras do DNA foram quantificadas no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®) do Departamento de Bioquímica da UFPR e foram mantidas a - 20° C até as análises.

Na PCR realizada para identificação de *N. caninum*, utilizou-se solução de amplificação, com o volume final de 25 µl, onde adicionou-se 70 ng de DNA extraído dos encéfalos dos cordeiros 1 e 2, 1X de tampão, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1U/µl de enzima *Taq* polimerase, água Mili-Q qsp e 0,5 pmol dos *primers* Np6 e Np21 (Yamage *et al.*, 1996). Na solução de amplificação utilizada para identificação de *T. gondii*, com o volume final de 25 µl, adicionou-se 70 ng de DNA extraído dos encéfalos dos cordeiros 1 e 2, 1X de tampão, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1U/µl de enzima *Taq* polimerase, água Mili-Q qsp e 0,5 pmol dos *primers* TOX 4 e TOX 5 (Homan *et al.*, 2000).

Para amplificação do DNA, as amostras contendo os reagentes e os *primers* Np6 e Np21, foram incubadas no termociclador Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler® programado previamente, para realizar desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 32 ciclos de 5 minutos a 72°C para desnaturação do DNA, 35 segundos a 94°C para anelamento dos *primers* ao DNA, 30 segundos a 54°C para extensão do DNA a partir dos *primers*. No final foi programado 1 ciclo de 30 segundos a 72°C para extensão final do DNA e posterior manutenção a 4°C, até a retirada das amostras do termociclador.

Para a amplificação do DNA das amostras contendo os reagentes e os *primers* TOX4 e TOX5, o termociclador foi programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 32 ciclos de 5 minutos a 72°C para desnaturação do DNA, 35 segundos a 94°C para anelamento dos *primers*, 30 segundos a 65°C para extensão do DNA. No final foi programado 1 ciclo de 30 segundos a 72°C para extensão final do DNA e posterior manutenção a 4°C, até a retirada das amostras. Os produtos de amplificação foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, no Thermo Scientific® a 95 volts.

2.3 RESULTADOS

3.3.1 Exame Sorológico

Os exames sorológicos realizados na ovelha mãe, em 2014 e 2015, após os nascimentos dos cordeiros 1 e 2, respectivamente, foram positivos para *N. caninum* e negativos para *T. gondii*. O título de anticorpos da ovelha foi de 1:50 (amostra do 5º dia pós-parto) e 1:100 (amostra do 15º dia pós-parto), em 2014 e 2015. Os taquizoítos de *N. caninum* com fluorescência periférica total estão apresentados na Figura 1.

O cordeiro 2 foi soropositivo para *Neospora caninum* (título 1:50) e soronegativo para *Toxoplasma gondii*.

As nove ovelhas que apresentaram problemas reprodutivos entre os anos de 2014 e 2015, foram soronegativas para *N. caninum* e para *T. gondii*.

3.3.2 Necropsia e exame histopatológico

Na necropsia do cordeiro 1, observou-se no encéfalo discreto achatamento dos giros cerebrais e discreto desvio lateral esquerdo do vermis cerebelar, nos demais órgãos não foram observadas alterações macroscópicas. No exame histopatológico verificou-se no neurópilo do lobo frontal do cérebro gliose focal, discreta, associada a manguitos perivasculares linfoplasmocitários (Figura 2). Não foram visualizadas alterações histopatológicas nos demais tecidos.

Na necropsia do cordeiro 2 verificou-se no cerebelo edema focal, bem delimitado, entre a membrana aracnoide e a pia-mater, próximo ao vermis inferior. Nos demais órgãos não foram observadas alterações macroscópicas. No exame histológico verificou-se no pedúnculo cerebelar e próximo ao hipocampo, manguitos perivasculares de intensidade discreta (Figura 3), e estruturas císticas (n=6), medindo 7 a 8µm de diâmetro, com parede espessa, bem delimitada, no interior do citoplasma de neurônios. (Figura 4 – A).

3.3.3 Exame Imuno-histoquímico

Nas amostras encefálicas do cordeiro 1, não foi verificada imunomarcação específica para *N. caninum*.

Cistos de *Neospora caninum* intraneuronais fortemente marcados foram observados na imuno-histoquímica realizada nas amostras encefálicas do cordeiro 2 (Figura 4 - B).

3.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR para *N. caninum* confirmou a presença do parasito nas amostras encefálicas dos cordeiros 1 e 2. As bandas 328 pb foram observadas no gel de agarose, com tamanho similar a banda obtida com o DNA de *Neospora caninum* (cepa NC-1) (Figura 5).

Na PCR para *T. gondii* não ocorreu amplificação e as bandas não foram observadas (Figura 6).

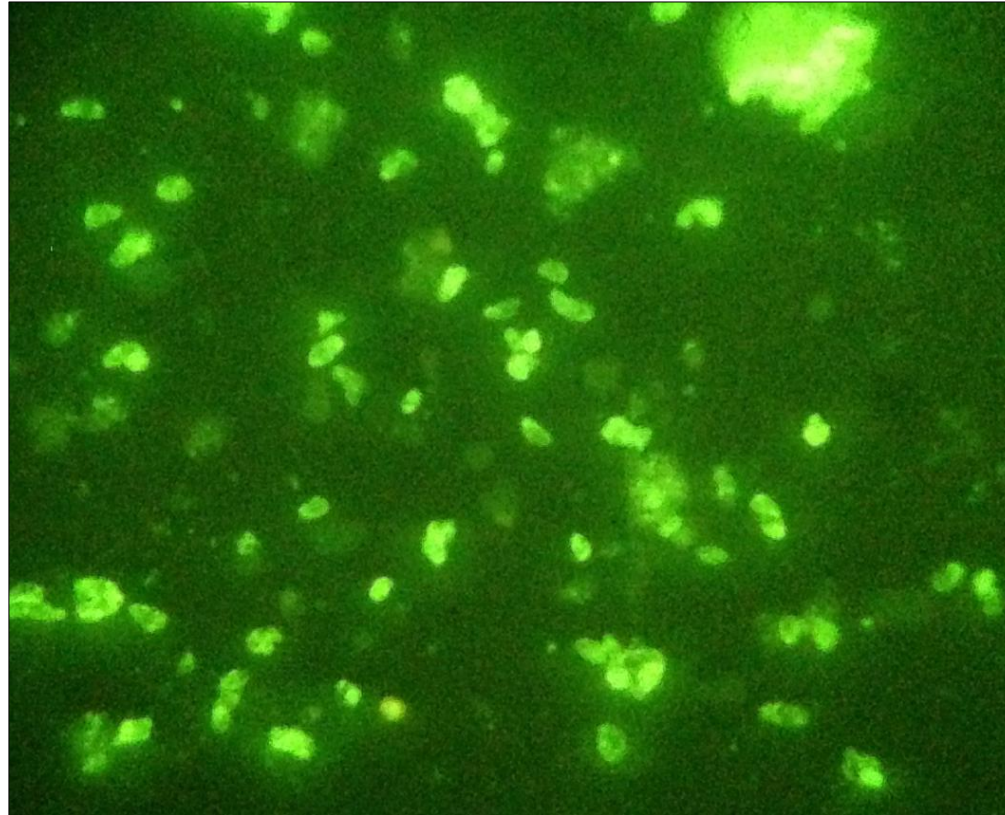


Figura 1. Taquizoítos de *N. caninum* com fluorescência periférica total. Resultado positivo de imunofluorescência indireta da ovelha mãe, na titulação 1:100, 1000x.

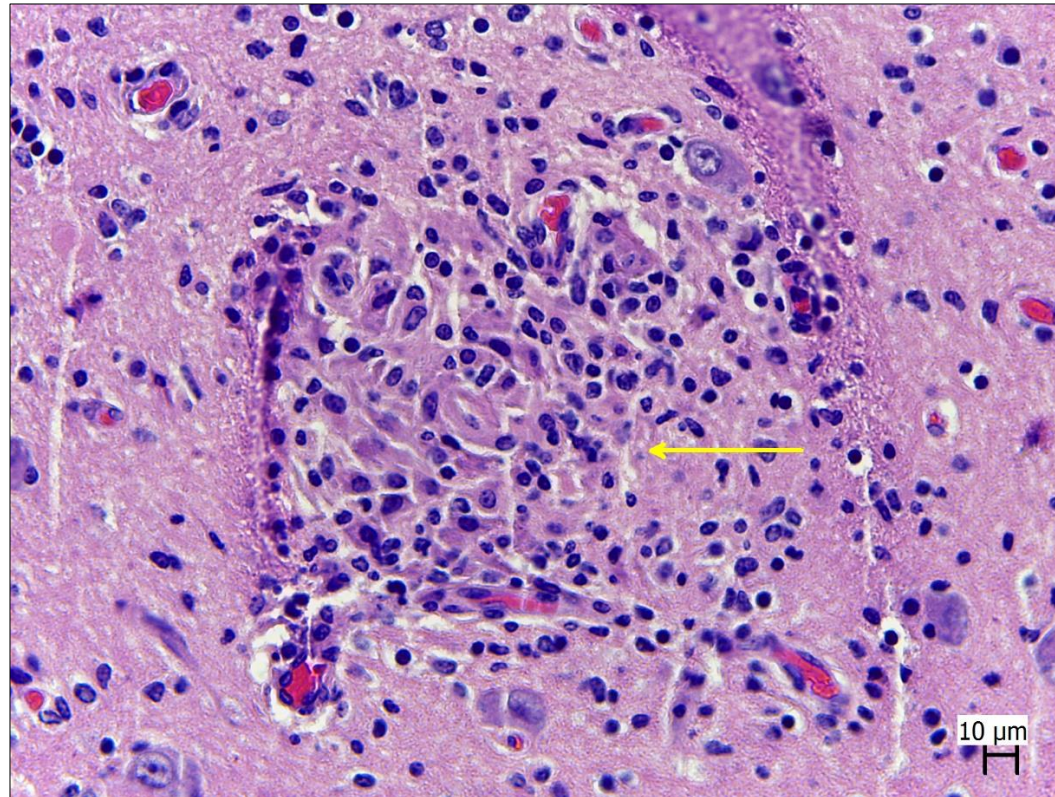


Figura 2. Lesão histopatológica no SNC (córtex - lobo frontal) do cordeiro 1 infectado por *N. caninum*. Área de gliose focal, discreta (seta), H&E. Barra: 10 μm.

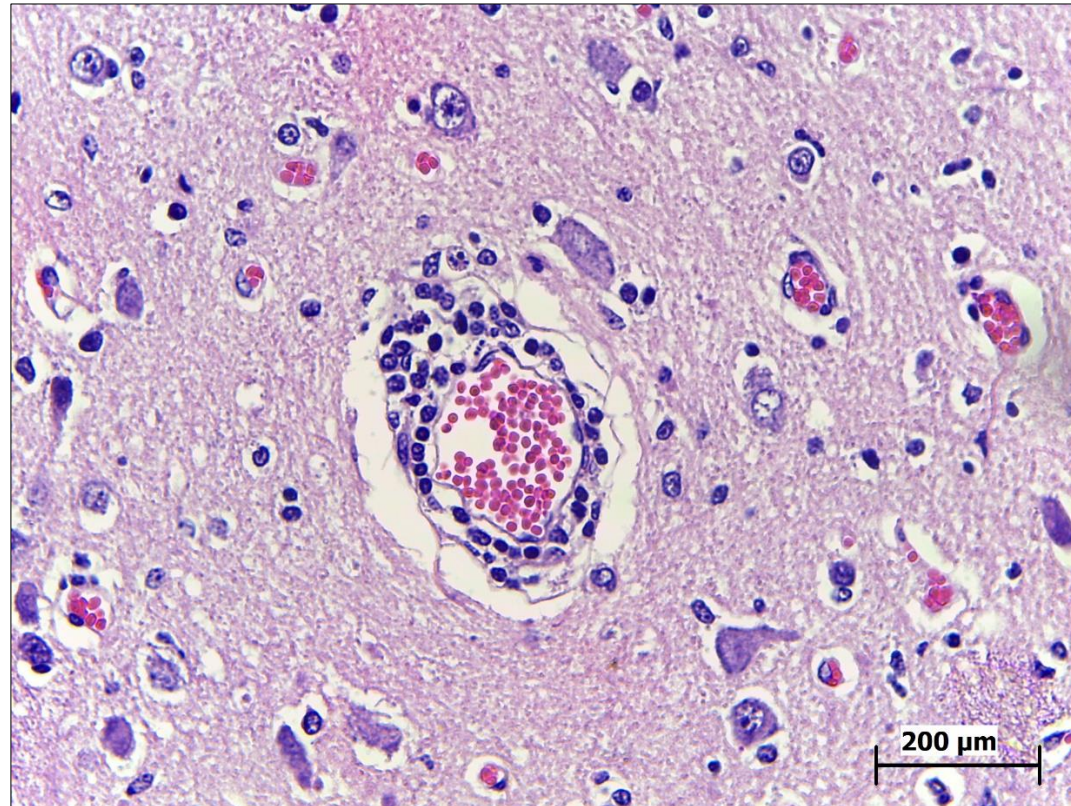


Figura 3. Lesão histopatológica no SNC (região de hipocampo) do cordeiro 2 infectado por *N. caninum*. Presença de manguito perivascular linfoplasmocitário. H&E. Barra: 200μm.

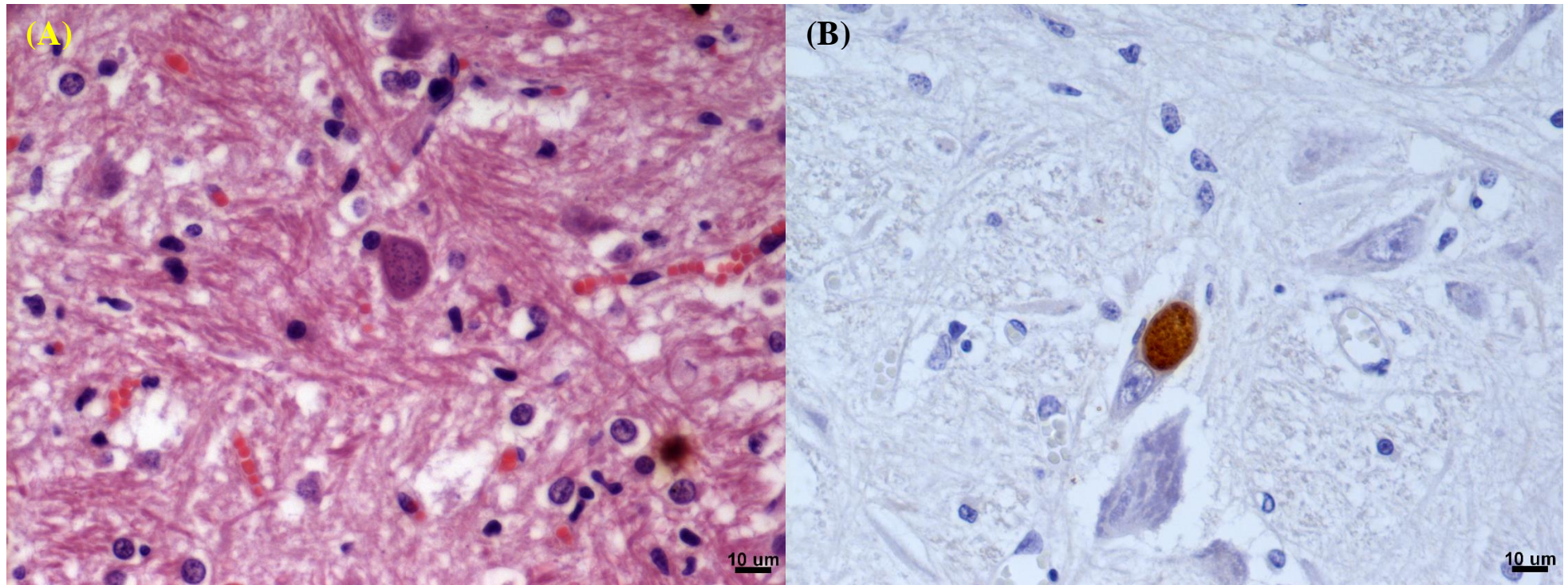


Figura 4. Neosporose em ovinos. Cordeiro 2. Encéfalo. A: Presença de cisto de *N. caninum* intraneuronais. H&E. Barra: 10 µm; B: Cisto de *Neospora caninum* intraneuronal fortemente marcado na imuno-histoquímica para *N. caninum*. Método estreptavidina-biotina-peroxidase. DAB. Barra: 10µm.

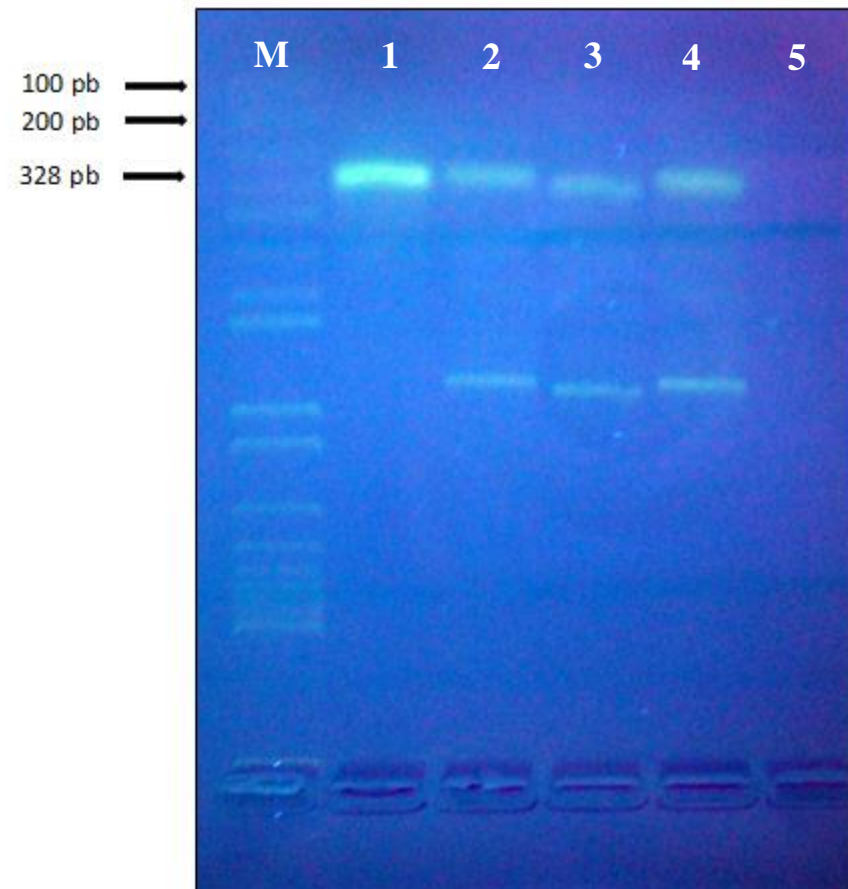


Figura 5. Reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA do protozoário *N. caninum* no encéfalo dos cordeiros 1 e 2. **M** - Marcador molecular Ladder 1 kb plus DNA; **1** - Controle positivo (cepa referência NC-1 de *N. caninum*); **2** - cordeiro recém-nascido doente; **3** - cordeiro natimorto; **4** - repetição cordeiro recém-nascido doente; **5** - controle negativo (H₂O).

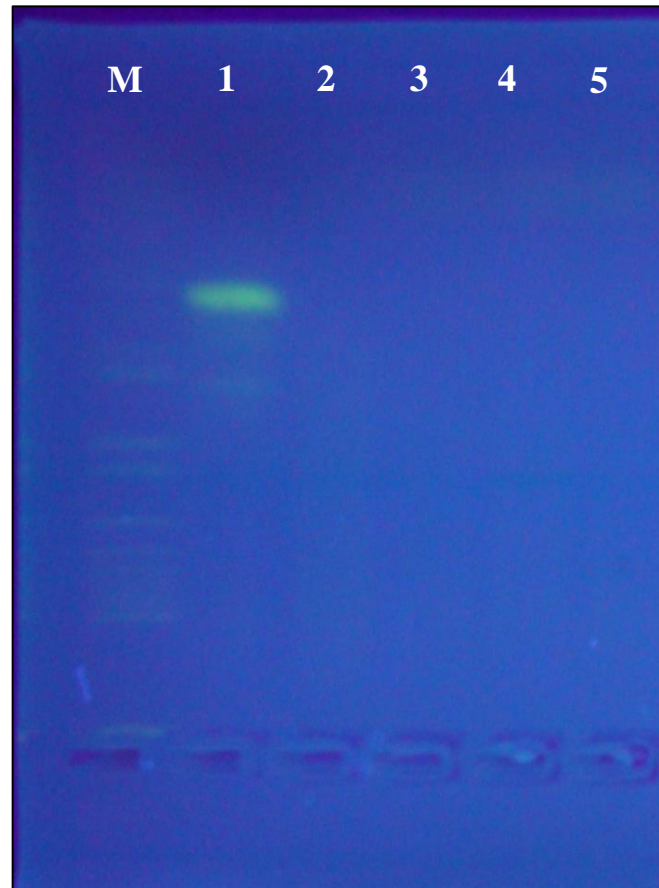


Figura 6. Reação em cadeia da polimerase para detecção do DNA do protozoários *T. gondii* no encéfalo dos cordeiros 1 e 2. **M** - Marcador molecular Ladder 1 kb plus DNA; **1** - Controle positivo (cepa referência RH de *T. gondii*); **2** - cordeiro recém-nascido doente; **3** - cordeiro natimorto; **4** - repetição cordeiro recém-nascido doente; **5** - controle negativo (H₂O).

2.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato no Brasil de infecção congênita por *Neospora caninum* em cordeiros natimorto e recém-nascido com sinais neurológicos, descendentes da mesma ovelha, de gestações diferentes. O diagnóstico foi confirmado por exames histopatológico, imuno-histoquímico e PCR do encéfalo dos cordeiros. A manifestação clínica da neosporose em ovinos é pouco relatada no Brasil. No Mato Grosso do Sul, Pinto *et al.* (2012), descreveram casos de aborto por *N. caninum* em ovelhas naturalmente infectadas.

Nos cordeiros deste estudo, a transmissão da doença ocorreu por via vertical, principal via de manutenção da doença na espécie bovina (Björkman *et al.*, 1996; Dubey e Schares, 2011), pois detectou-se anticorpos anti-*N. caninum* no soro da mãe dos animais, assim como no soro do cordeiro natimorto e foi identificada a presença de DNA do parasito *Neospora caninum* no encéfalo de ambos os cordeiros. A placenta de ovinos é do tipo sindesmocorial, que impede a passagem da maioria dos agentes infecciosos para o feto. Na transmissão vertical, os taquizoítos de *N. caninum* danificam a barreira transplacentária, invadindo as células do útero, multiplicando-se e causando a destruição focal das porções materna e fetal da placenta, desencadeando uma resposta inflamatória e infectando o feto (Barr *et al.*, 1994; McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1997; Dubey, Buxton e Wouda, 2006).

As alterações histopatológicas visualizadas no encéfalo do cordeiro 1 e 2, são compatíveis com as lesões causadas pela neosporose no cérebro de bovinos e caprinos, que consiste em gliose, necrose e manguitos perivasculares linfoplasmocitários (Dubey e Lindsay, 1990; Varaschin *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2014). Contudo na espécie ovina, pela similaridade dos sinais clínicos e dos achados histopatológicos, a neosporose pode ser confundida com a toxoplasmose, principal causa de abortos em ovelhas (Edwards e Dubey, 2013; Pinto *et al.*, 2012), demonstrando a necessidade de métodos diagnósticos definitivos, para confirmação da doença.

As outras doenças infecciosas consideradas no diagnóstico diferencial da neosporose em ovinos, são as doenças bacterianas que apresentam como alvo o feto, sendo a listeriose (Low e Donachie, 1991; Wesley *et al.*, 2002; Sahin e Beytut, 2006; Rissi *et al.*, 2010), a campilobacteriose (Hedstrom *et al.*, 1987; Campero *et al.*, 2005; Gressler *et al.*, 2012), o aborto enzoótico em ovinos (Buxton *et al.*, 1990; Buxton *et al.*, 2002) e a brucelose (Hartley, 1961; Osburn e Kennedy, 1966; Gorham *et al.*, 1986).

Estas doenças causam lesões importantes principalmente no tecido pulmonar e hepático dos fetos, o que não foi observado neste estudo, pois os cordeiros apresentaram alterações histopatológicas somente no encéfalo. Em outros relatos de aborto e nascimento de cordeiros doentes, congenitamente infectados por *N. caninum* (PCR positiva), os animais não apresentaram lesões histopatológicas em outros tecidos, além do sistema nervoso central (Hässig *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2012; González-Warleta *et al.* 2014; Syed-Hussain *et al.*, 2015).

A listeriose também pode causar lesões no tecido encefálico de animais jovens, que desenvolvem meningoencefalite supurativa, caracterizada por microabscessos e infiltrado inflamatório neutrofílico (Low e Donachie, 1991; Wesley *et al.*, 2002; Rissi *et al.*, 2010), diferente das lesões verificadas neste estudo, onde observou-se no encéfalo dos cordeiros, encefalite não supurativa, caracterizada por infiltrado inflamatório mononuclear e manguitos perivasculares linfoplasmocitários.

Neste trabalho, cistos intraneuronais de *Neospora caninum* foram visualizados no encéfalo do cordeiro 2, resultado também observado por Kobayashi *et al.* (2001). Os autores descreveram a presença de cistos de *N. caninum* intraneuronais no SNC de fetos ovinos congenitamente infectados com o protozoário. Esta fase do parasito também foi observada, no SNC de ovinos, por Jolley *et al.* (1999), Hassig *et al.* (2003) e González-Warleta *et al.* (2014). Entretanto, no cordeiro 1 a confirmação da infecção por *N. caninum* foi pela PCR, porque os parasitos não foram visualizados no encéfalo do cordeiro pela técnica de imuno-histoquímica, resultado similar ao observado por O'Handley *et al.* (2002).

Na ovelha mãe, observou-se uma variação do título de anticorpos anti-*N. caninum*, que aumentou quinze dias após os partos dos cordeiros 1 e 2 (título 1:100). Jolley *et al.* (1999), descreveram o aumento do título de anticorpos anti-*N. caninum*, de ovelha experimentalmente infectada, dois meses após abortar feto congenitamente infectado com o protozoário *N. caninum*. Os títulos variaram de 1:400 (67 dias de gestação) a 1:3200 (20 dias após o abortamento). O título de 1:100, detectado neste trabalho, é similar ao descrito por West *et al.* (2006) em ovelhas com histórico de abortamento, porém, em outros trabalhos (Kobayashi *et al.*, 2001; Howe *et al.*, 2008), os autores relataram título alto de anticorpo anti-*N. caninum* em ovelhas com distúrbios reprodutivos, assim como observado em vacas (Conrad *et al.*, 1993).

A ovelha mãe dos cordeiros 1 e 2, pertencia a um rebanho localizado na região metropolitana de Curitiba (PR). No estado do Paraná, a prevalência sorológica para

N. caninum em ovinos varia de 9,5% (Romanelli *et al.*, 2007) a 13,91% (Munhóz *et al.*, 2010), demonstrando que os ovinos criados no estado estão expostos a doença. E no Brasil, há uma das mais altas soroprevalências do mundo para *N. caninum* em ovinos (Tembue *et al.*, 2011), destacando a seriedade da doença no país.

2.5 CONCLUSÃO.

O protozoário *Neospora caninum* causa distúrbios reprodutivos em ovelhas naturalmente infectadas, como o nascimento de cordeiros natimortos e recém nascidos com sinais neurológicos. Quando infectadas, as ovelhas transmitem a doença por via vertical em diferentes gestações.

A visualização de alterações histopatológicas compatíveis com as lesões típicas da neosporose, a presença de cistos de *N. caninum* marcados por imunohistoquímica e a detecção do DNA do protozoário nas amostras de encéfalo dos cordeiros natimorto e doente, naturalmente infectados, associados ao exame sorológico positivo para *N. caninum* da mãe dos cordeiros, confirmam a infecção e transmissão vertical do protozoário *Neospora caninum* em ovinos.

REFERÊNCIA

- ALVES, C. J.; FIGUEIREDO, S. M.; AZEVEDO, S. S.; CLEMENTINO, I. J.; KEID, L. B.; VASCONCELLOS, S. A.; BATISTA, C. S. A.; ROCHA, V. C. M.; HIGINO, S. S. Detection of *Brucella ovis* in ovine from Paraíba State, in the Northeast region of Brazil. **Journal of Microbiology**. v. 41, n.2, 2010.
- ANASTASIA, D.; ELIAS, P.; NIKOLAOS, P.; CHARILAOS, K.; ANDEKTARIOS, G. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* Seroprevalence in Dairy Sheep and Goats Mixed Stock Farming. **Veterinary Parasitology**. v. 198, p. 387-390, 2013.
- BARR, B. C.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; BONDURANT, R. H.; ARDANS, A. 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.
- BISHOP, S.; KING, J.; WINDSOR, P.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J.; ŠLAPETA, J. The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 137-142, 2010.
- BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 208, p. 1441-1444, 1996.
- BUXTON, D.; ANDERSON, I. E.; LONGBOTTOM, D.; LIVINGSTONE, M.; WATTEGEDERA, S.; ENTRICAN, G. Ovine Chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. **Journal of Comparative Pathology**. v. 127, p. 133-141, 2002.
- BUXTON, D.; BARLOW, R. M.; FINLAYSON, J.; ANDERSON, I. E.; MACKELLAR, A. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**. v.102, p. 221-237, 1990.

BUXTON, D.; MALEY, S. W.; THOMSON, K. M.; TREES, A. J.; INNES, E. A. Experimental Infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**. v. 117, p. 1-16, 1997.

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

CAMPERO, C. M.; ANDERSON, M. L.; WALKER, R. L.; BLANCHARD, P. C.; BARBANO, L.; CHIU, P.; MARTÍNEZ, A.; COMBESSIENS, G.; BARDON, J. C.; CORDEVIOLA, J. Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 52, p.138-141, 2005.

CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, A.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; MEDINA-ESPARZA, L. *Neospora caninum*: Seroprevalence and DNA detection in blood of sheep from Aguascalientes, Mexico. **Small Ruminant Research**. v. 119, p.182–186, 2014.

CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J. P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 5, p. 572-578, 1993.

COSTA, R. C.; ORLANDO, D. R.; ABREU, C. C.; NAKAGAKI, K. Y. R.; MESQUITA, L. P.; NASCIMENTO, L. C.; SILVA, A. C.; MAIORKA, P. C.; PECONICK, A. P.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. **BMC Veterinary Research**. v. 10, p. 291, 2014.

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

DUBEY, J. P.; HARTLEY, W. J.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. **The Journal of Parasitology**. v. 76, p. 127-130, 1990.

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.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 67, p. 1-5, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, S. D. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 2, p. 230-233, 1990.

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

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

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

DUBEY, J.P.; VIANNA, M.C.; KWOK, O.C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; TUO, W.; VELMURUGAN, G.V.; CONORS, M.; JENKINS, M.C. Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v.149, p.158-166, 2007.

EBADI, A.; MOOSAKHANI, F.; JAMSHIDIAN, M. Phylogenetic Analysis of *Chlamydia abortus* Isolated from fetus aborted ewes of Alborz Province. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**. v. 4, n. 6, p.122-126, 2015.

EDWARDS, J. F.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an aborted lamb from a chronically infected ewe. **Veterinary Parasitology**. v. 18, n. 192, p. 129-36, 2013.

FARIAS, A. E. M.; HIGINO, S. S.S.; AZEVEDO, S. S.; COSTA, D. F.; SANTOS, F. A.; SANTOS, C. S. A. B.; PIATTI, R. M.; ALVES, E. C. J. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à infecção por *Chlamydophila abortus* em ovinos deslanados do semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 3, p. 286-290, 2013.

FIGLIUOLO, L. P. C., KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.123, p. 161–166, 2004a.

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO [2013]. Production: live animals, livestock primary, livestock processed. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> >. Acesso em: 05 jan. 2016.

GABARDO M. P.; OLIVEIRA, J. S. V.; ECCO, R.; GUEDES, R. M. C. Outbreak of ovine abortion by toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 6, p. 37-41, 2013.

GHAREKHANI, J.; GH. R. TAVOOSIDANA AND M. ZANDIEH. Seroprevalence of *Neospora caninum* in sheep from Western Iran. **Veterinary World**. v. 6, n. 10, p. 709, 2013.

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.; REGIDOR-CERRILLO, J.; BENAVIDES, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; FUERTES, M.; ORTEGA-MORA, L. M.;

- MEZO, M. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. **Veterinary Research**. v. 45, n. 88, p. 1-9, 2014.
- GORHAM, S. L.; ENRIGHT, F. M.; SNIDER III, T. G.; ROBERTS, E. D. Morphologic lesions in *Brucella abortus* infected ovine fetuses. **Veterinary Pathology**. v. 23, p. 331-332, 1986.
- GRESSLER, L. T.; KIRINUS, J. K.; MACHADO, G.; LIBARDONI, F.; VARGAS, A. C. *Campylobacter fetus* subespécie fetus: abortamento e natimortalidade em ovinos. **Ciência Rural**. v.42, n.4, p.697-700, 2012.
- GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J. M.; MORAES, L. M.B.; SILVA, A. T.; SANTOS, H. A.; PIRES, M. S.; MACHADO, R. Z.; BALDAN, C. D. Occurrences of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from four districts of Tocantins state, Brazilian Legal Amazon Region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 2, p.110-114, 2015.
- HARTLEY, W. J. The pathology of *Brucella ovis* infection in the pregnant ewe. **NEW ZEALAND VETERINARY JOURNAL**. v. 9, p. 115-120, 1961.
- HÄSSIG, M.; SAGER, H.; REITT, K.; ZIEGLER, D.; STRABEL, D.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Veterinary Parasitology**. v. 117, p. 213–220, 2003.
- HECKER, Y. P.; MOORE, D. P.; MANAZZA, J. A.; UNZAGA, J. M.; SPÄTH, E. J. A.; PARDINI, L. L.; VENTURINI, M. C.; ROBERI, J. L.; CAMPERO, C. M. First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy sheep from Humid Pampa, Argentina. **Tropical Animal Health Production**. v. 45, p.1645–1647, 2013.
- HEDSTROM, O. R.; SONN, R. J.; LASSEN, E. D.; HULTGREN, B. D.; CRISMAN, R. O.; SMITH, B. B.; SNYDER, S. P. Pathology of *Campylobacter jejuni* abortion in sheep. **Veterinary Pathology**.v. 24, p. 419-426, 1987.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; BRAEKELLER, J. D.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 pb DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**. v. 30, p. 69-75, 2000.

HOWE, L.; COLLETT, M. G.; PATTISON, R. S.; MARSHALL, J.; WEST, D. M.; POMROY, W. E. Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in New Zealand. **Veterinary Parasitology**. v. 185, p. 64– 71, 2012.

HOWE, L.; WEST D. M.; COLLETT, M. G.; TATTERSFIELD, G.; PATTISON, R. S.; POMROY, W. E.; KENYON, P. R.; MORRIS, S. T.; WILLIAMSON, N. B. The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the Southern North Island of New Zealand. **Small Ruminant Research**. v. 75, p. 115–122, 2008.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Produção de pecuária municipal**. v. 41, 2013. Disponível em:
ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf . Acesso em: 06 jan. 2016.

JOLLEY, W. R.; MCALLISTER, M. M.; MCGUIRE, A. M.; WILLS, R. A. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. **Veterinary Parasitology**. v. 82, p.251-257, 1999.

KING, J. S.; SLAPETA, J. J. 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.

- KOYAMA, T.; KOBAYASHI, Y.; OMATA, Y.; YAMADA, M.; FURUOKA, H.; MAEDA, R.; MATSUI, T.; SAITO, A.; MIKAMI, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. **The Journal of Parasitology**. v. 87, p. 1486–1488, 2001.
- LANGONI, H.; GRECA, H. J.; GUIMARÃES, F. F.; ULLMANN, L. S.; GAIO, F. C.; UEHARA, R. S.; ROSA, E. P. AMORIM, R. M.; SILVA R. C. Serological profile of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 177, p. 50–54, 2011.
- LOW, J. C.; DONACHIE, W. Clinical and serum antibody responses of lambs to infection by *Listeria monocytogenes*. **Research in Veterinary Science**. v. 51, p. 185-192, 1991.
- McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; McGUIRRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.
- McALLISTEAR, M. M.; McGUIREW, M.; JOLLEY, R.; LINDSAY, D. S.; TREES, A. J.; STOBART, R. H. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Veterinary Pathology**. v. 33, p. 647-655, 1996.
- MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H. A.; MACEDO, G. L. J.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, n. 4, 2011.
- MORENO, B.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; VILLA, A.; NAVARRO, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary Parasitology**. v. 187, p. 312-318, 2012.
- MUNHÓZ, K. F.; NETO, M. L.; SANTOS, S. M. A.; GARCIA, J. L.; GUIMARÃES, J. S. J.; VIDOTTO, O.; HEADLEY, S. A.; YAMAMURA, M. H. Occurrence of anti-

Neospora caninum antibodies in sheep from farms located in northern Parana, Brazil. **Revista Semina**. v. 31, n. 4, p. 1031-1040, 2010.

NASIR, A.; ASHRAF, M.; KHAN, M. S.; JAVEED, A.; YAQUB, T.; AVAIS, M.; REICHEL, M. P. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in sheep and goats in Pakistan. **The Journal of Parasitology**. v. 98, n. 1, p. 213–215, 2012.

O'HANDLEY, R.; LIDDELL, S.; PARKER, C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v.88, p.1120-1123, 2002.

OSBURN, B. I.; KENNEDY, P. C. Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to *Brucella ovis*. **Veterinary Pathology**. v. 3, p. 110-136, 1966.

OSHIRO, L. M.; REIS, F. A.; DITTRICH, R. L.; CUNHA, R. C. ANDREOTTI, R. Serology for Toxoplasmosis and Neosporosis in ewes in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Veterinary Science & Technology**. v. 6, p. 1-5, 2015.

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 Investigations**, v.7, p. 273-275, 1995.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; RAGOZO, A. M. A.; MONTEIRO, R. M.; YAI, L. E. O.; NISHI, S. M.; GENNARI, S. M. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.147, p. 61–66, 2007.

PINTO, A. P.; BACHA, F. B.; SANTOS, B. S.; DRIEMEIER, D.; ANTONIASSI, N. A. B.; RIBAS, N. L. K. S; LEMOS, R. A. A. Sheep abortion associated with *Neospora caninum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 8, p.739-742, 2012.

RIBEIRO, L. A. O.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Prenhez em rebanhos ovinos do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. v. 32, n. 4, p. 637-641, 2002.

RISSI, D. R.; KOMMERS, G. D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SCHILD, A. L.; BARROS, C. S. L. Meningoencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n.1, 2010.

ROCHA, D. S.; GUIMARÃES, L. A.; BEZERRA, R. A.; MENDONÇA, C. E. A.; DÓREA, T. G.; MUNHOZ, A. D.; ALBUQUERQUE, G. R. Seroprevalence and factors associated with *Neospora caninum* infection in sheep from southeastern Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 36, n. 4, p. 443-447, 2014.

ROMANELLI, P. R.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R.; OGAWA, L. P. V. S.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil. **Research in Veterinary Science**. v. 82, p. 202-207, 2007.

ROSA, L. D.; MOURA, A. B.; GÜTHS, M. F.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SOUZA, A. P. Prevalência e fatores de risco para infecção por *Neospora caninum* em ovinos no município de Lages, Santa Catarina, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v. 10, n. 2, p.127-137, 2011.

ROSSI, G. F.; CABRAL, D. B, RIBEIRO, D. P.; PAJUABA, A. C. A. M.; CORRÊA, R. R.; MOREIRA, R. Q.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**. v. 175, p. 252–259, 2011.

SAHIN, M.; BEYTUT, E. Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii* in the Kars region. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. v. 30, p. 503-506, 2006.

SANTOS, F. A.; HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S.; COSTA, D. F.; FARIAS, A. E.M.; ALVES, F. A.L.; PAULIN, L. M.; ALVES, C. J. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em ovinos deslançados do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 4, 2013.

SASANI, F.; JAVANBAKHT, J.; SEIFORI, P.; FATHI, S.; AGHAMOHAMMAD HASSAN, M. *Neospora caninum* as causative agent of ovine encephalitis in Iran. **Pathology Discovery**. p. 1-5, 2013.

SHARMA, R. N.; BUSH, J.; TIWARI, K.; CHIKWETO, A.; BHAIYAT, M. I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in sheep and goats from Grenada, West Indies. **Open Journal of Veterinary Medicine**. v. 5, p. 219-223, 2015.

SHOUKAT, S.; MALIK, S. V. S.; RAWOOL, D. B.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; SHRIVASTAVA, S; BARBUDDHE, S. B.; DAS, D. P.; DAS, S. A Study on Detection of Pathogenic *Listeria monocytogenes* in Ovine's of Kashmir Region Having Abortion or History of Abortion. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences** v. 84, n. 2, p. 311–316, 2014.

SILVA, F. G.; FREITAS, J. C.; MÜLLER, E. E. *Chlamydophila abortus* em animais de produção. **Ciência Rural**. v. 36, n. 1, 2006.

SOARES, H. S.; AHID, S. M.M.; BEZERRA, A. C. D. S.; PENA, H. F. J.; RICARDO, A. D.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 160, p. 211–214, 2009.

SYED-HUSSAIN, S .S.; HOWE, L.; POMROY, W.E.; WEST, D. M. D.; HARDCASTLEC, M.; WILLIAMSON, N.B. Vertical transmission in experimentally infected sheep despite previous inoculation with *Neospora caninum* NcNZ1 isolate. **Veterinary Parasitology**. v. 208, p. 150–158, 2015.

SYED-HUSSAIN, S. S.; HOWE, L.; POMROY, W. E.; WEST, D. M.; SMITH, S. L.; WILLIAMSON, N. B. Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. **Veterinary Parasitology**. v. 197, p. 534-542, 2013.

TEMBUE, A. A.; RAMOS, R. A.; SOUSA, T. R.; ALBUQUERQUE, A. R.; COSTA A. J.; MEUNIER, I. M. J.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Serological survey of *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p. 246-248, 2011.

VARASCHIN, M. S.; HIRSCH, C.; WOUTERS, F.; NAKAGAKI, K. Y.; GUIMARÃES, A. M.; SANTOS, D. S.; BEZERRA, P. S. J.; COSTA, R. C.; PECONICK, A. P.; LANGOHR, I. M. Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**. v. 50, n. 1, p. 63-67, 2012.

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

WARETH, G.; MELZER, F.; TOMASO, H.; ROESLER, U.; NEUBAUER, H. Detection of *Brucella abortus* DNA in aborted goats and sheep in Egypt by real-time PCR. **BMC Research Notes**. v. 8, p. 212, 2015.

WESLEY, I. V.; LARSON, D. J.; HARMON, K. M.; LUCHANSKY, J. B.; SCHWARTZ, A. R. A case report of sporadic ovine listerial meningoencephalitis in Iowa with an overview of livestock and human cases. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 14, p. 314–321, 2002.

WEST, D. M.; POMROY, W. E.; COLLETT, M. G.; HILL, F. I.; RIDLER, A. L.; KENYON, P. R.; MORRIS, S. T.; PATTISON, R. S. A possible role for *Neospora caninum* in ovine abortion in New Zealand. **Small Ruminant Research**. v. 62, p. 135–138, 2006.

WESTON, J. F.; HOWE, L.; COLLETT, M. G.; PATTISON, R. S.; WILLIAMSON, N. B.; WEST, D. M.; POMROY, W. E.; SYED-HUSSAIN, S. S.; MORRIS, S. T.; KENYON, P. R. Dose-titration challenge of young pregnant sheep with *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary Parasitology**. v. 164, p. 183-191, 2009.

WU, Z.; SIPPY, R.; SAHIN, O.; PLUMMER, P.; VIDAL, A.; NEWELL, D.; ZHANG, Q. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter fetus* isolates associated with sheep abortion in the United States and Great Britain. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52 n. 6, p. 1853-1861, 2014.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, verificou-se a região do encéfalo de camundongo BALB/c mais acometida pelo protozoário *N. caninum* e as diferenças de patogenicidade apresentadas pelas cepas NC-1, BNc-1 e BNc4-PR. Os resultados podem ser aplicados no diagnóstico definitivo da doença, sendo necessários mais estudos para extrapolar os dados para as demais espécies.

Mais pesquisas sobre a neosporose devem ser realizadas, para melhor compreensão da virulência do protozoário e da patogênese da doença, pois dessa forma, obteremos maior êxito na realização de técnicas diagnósticas para detecção do agente, na descoberta de tratamentos e na produção de vacinas.

Neste estudo observamos que o parasito *Neospora caninum* causa sinais neurológicos em cordeiros recém-nascidos, assim como relatado na espécie bovina, demonstrando que a neosporose deve ser incluída no diagnóstico diferencial para as doenças neurológicas em ovinos.

Relatar casos da infecção natural pelo protozoário *N. caninum* é de fundamental relevância para compreender a real incidência epidemiológica do parasito e para estabelecer a verdadeira importância clínica e econômica da doença nas espécies animais.

5. ANEXOS

5.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 048/2014, referente ao projeto “Caracterização da infecção experimental por *Neospora caninum* (cepas Nc-1, BNc-1 e BNc4-PR) em camundongos BALB-c”, sob a responsabilidade de Kamila Alcalá Gonçalves, na forma em que foi apresentado (utilização de 31 camundongos e como grau E de invasividade), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 10 de Outubro de 2014.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 048/2014, regarding the project “Characterization of experimental infection by *Neospora caninum* (Nc-1, BNc-1 and BNc4-PR strains) in BALB-c mice”, under Kamila Alcalá Gonçalves’ supervision, in the terms it was presented (use of 31 mice and was classified as grade E of invasiveness), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of Paraná, Brazil) during session on October 10th, 2014.

Curitiba, 10 de Outubro de 2014.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ricardo'.

Ricardo Guilherme D’Otaviano de Castro Vilani
Presidente CEUA-SCA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ananda'.

Ananda Portella Félix
Vice-Presidente CEUA-SCA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO ADICIONAL

Certificamos que o protocolo número 048/2014, referente ao projeto “Caracterização da infecção experimental por *Neospora caninum* (cepas Nc-1, BNc-1 e BNc-4) em camundongos Balb/c”, sob a responsabilidade de Kamila Alcalá Gonçalves, poderá utilizar um adicional de 18 camundongos fêmeas para a conclusão do trabalho. O projeto foi classificado como grau E de invasividade e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Brasil, em reunião realizada dia 10 de outubro de 2014. Este certificado adicional foi aprovado em reunião realizada dia 13 de Março de 2015.

ADDITIONAL CERTIFICATE

We certify that the protocol number 048/2014, regarding the project “Characterization of experimental infection by *Neospora caninum* (Nc-1, BNc-1, and BNc-4 strains) in Balb/c mice”, under Kamila Alcalá Gonçalves supervision, can use additional 18 female mice to complete the work. The project was classified as grade E of invasiveness and was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Brazil) during session on October 10, 2014. This additional certificate was approved during session on March 13, 2015.

Curitiba, 13 de Março de 2015.

Ananda Portella Félix
Presidente CEUA-SCA

Simone Tostes de Oliveira Stedile
Vice-Presidente CEUA-SCA

5.2 PROTOCOLO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

5.2.1 Preparação das amostras

Os tecidos emblocados em parafina foram seccionados em micrótomo com espessura de 4µm e distendidos em lâminas de vidro aderentes com carga positiva (ImmunoSlide - EasyPath®). As lâminas foram mantidas em estufa por 24 horas a temperatura de 56°C. Subsequentemente, a remoção da parafina foi realizada mediante imersão em xilol (dois banhos de dez minutos), sendo reidratados em graduações decrescentes de álcool etílico (Absoluto, 96°, 80°, 70° - 2 minutos cada) e, por fim, em água destilada.

5.2.2 Recuperação antigênica

A recuperação antigênica foi realizada por meio de irradiação em forno micro-ondas de uso doméstico (800 watts) por seis minutos, com as lâminas dispostas em uma cuba, submersas em 100 mL de tampão citrato (pH 6,0), em banho-maria. Após o resfriamento do material (20 minutos), as lâminas foram lavadas por cinco minutos em PBS.

5.2.3 Bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por incubação do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (3,0mL de H₂O₂ em 97,0mL de solução de água destilada (50%) e metanol (50%)) por 20 minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com leite em pó desnatado (Molico®) a 5%, em temperatura ambiente (18 a 22°C) por 60 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas em solução TBS por um minuto.

5.2.4 Anticorpo primário

Foi utilizado o anticorpo primário anti-*N. caninum* (VMRD, Pullman, Washington, USA), na diluição de 1:2200, sendo distribuído sobre as amostras e incubado por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. (Controle positivo= foram utilizadas amostras teciduais contendo o protozoário *N. caninum*; Controle negativo= o anticorpo primário foi substituído por tampão fosfato-salino – PBS).

5.2.5 Anticorpo secundário

Após três lavagens com TBS as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-cabra biotinilado (Dako®, USA), em câmara úmida à temperatura ambiente (27°C) por vinte minutos.

5.2.6 Sistema de detecção e revelação das reações

Para a detecção da reação foi utilizado o complexo estreptavidina-biotina (kit LSAB, Dako®), sendo as amostras incubadas por vinte minutos em câmara úmida, finalizando o processo com três lavagens em TBS. Para visualização e revelação da reação se utilizou o cromógeno DAB (DAB Substrate Pack, Concentrated - BIOGENEX®, USA) por cinco minutos, observando a coloração conforme a instrução do fabricante.

Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina por um minuto, sendo novamente lavadas em água corrente e submetidas a bateria de desidratação e montagem com resina sintética (ENTELLAN-MERCK®, USA).