UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

Infecção experimental em cães com ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) infectados com taquizoítas de *Neospora caninum*

Patrícia Iriê Furuta
Médica Veterinária

Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

JABOTICABAL, SP - BRASIL
Setembro/2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PATRÍCIA IRIÊ FURUTA – solteira, nascida na cidade de São Paulo, São Paulo, em 25 de março de 1977, sob filiação de Iwao Furuta e Akie Fujimura Furuta. Cursou o primário, ginásio e colegial na escola marista, Colégio Arquidiocesano, São Paulo- SP. É Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal – SP, em 2001. Durante o curso de graduação, foi bolsista de iniciação científica do CNPq. Em março de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal – SP, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Ingressou no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia Veterinária, FCAV-Unesp, em agosto de 2004.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 2

2.1. Histórico 2

2.2. Modelos Experimentais 7

2.3. Diagnóstico 9

3. OBJETIVOS 11

3.1. Objetivo Geral 11

3.1.1. Objetivos Específicos 11

4. MATERIAL E MÉTODOS 12

4.1. Amostra de *Neospora caninum* (NC-1) 12

4.2. Infecção experimental de ovos embrionados de galinhas (SPF) com taquizoítas de *N. caninum* 12

4.3. Origem e manutenção dos cães 13

4.4. Infecção experimental dos cães 14

4.4.1. Exames coprológicos 17

4.4.2. Exames sorológicos 17

4.4.3. Exame Necroscópico e Exame Histopatológico 17

4.5. Detecção de anticorpos anti- *N. caninum* pela RIFI 18

4.5.1. Preparação das lâminas 18

4.5.2. Reação de imunofluorescência indireta 19

4.6. Reação de Imuno-histoquímica 19

4.7. Reação de Imunofluorescência Indireta em Tecidos 20

4.8. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela Reação em Cadeia pela Polimerase 21

4.8.1. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em fragmentos de tecidos de cães experimentalmente infectados 21

4.8.2. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pelo Real-time PCR em fragmentos de tecidos de cães experimentalmente infectados 22

4.8.3. Detecção de DNA nos oocistos de *Neospora caninum* pela PCR, em fezes de cães experimentalmente infectados 23

4.8.4. Detecção de RNA mensageiro (m-RNA) dos genes Nc*SAG*-1 e Nc*SAG*-4 na membrana CA dos embriões inoculados 23

5. RESULTADOS 25

5.1. Inoculação de taquizoítas de *Neospora caninum* em ovos embrionados 25

5.2. Infecção experimental dos cães 27

5.2.1. Exame coprológico 27

5.2.2. Exames sorológicos 30

5.3. Alterações macroscópicas dos órgãos e tecidos à necropsia 31

5.4. Exame histopatológico 33

5.5. Análise Imuno-histoquímica 38

5.6. Reação de Imunofluorescência Indireta em tecido 41

5.7. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR 46

5.7.1. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em fragmentos de tecidos de cães experimentalmente infectados 46

5.7.2. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pelo Real-time PCR em fragmentos de tecidos de cães experimentalmente infectados 47

5.7.3. Estudo comparativo de diagnósticos da neosporose pelas técnicas de IHQ, RIFIT a Real-time PCR 48

5.7.4. Detecção de DNA de oocisto de *Neospora caninum* pela PCR em fezes de cães experimentalmente infectados 50

6. Detecção de RNA mensageiro (m-RNA) dos genes Nc*SAG*-1 e Nc*SAG*-4 na membrana CA dos embriões inoculados 51

7. DISCUSSÃO 52

8. CONCLUSÕES 58

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Taquizoítas (seta) de *Neospora caninum* encontrados em estiraços de membrana cório-alantóide de ovos de *Gallus gallus domesticus* inoculados experimentalmente com a cepa NC-1. A fresco. 400x. 25

Figura 2: Embrião de galinha experimentalmente infectado com *Neospora caninum.* (A) Lesões macroscópicas amarelo-esbranquiçadas (seta branca) na membrana cório-alantóide; (B) Imunomarcações do parasito na membrana CA pela imuno-histoquímica (*, 200x); (C) Marcações fluorescentes do parasito na membrana CA (RIFIT, 200x, *); (D) Presença do parasito na membrana CA (*) com presença de infiltrado inflamatório misto (coloração de hematoxilina-eosina, #, 200x). 26

Figura 3: Oocistos de *Neospora caninum* não esporulado (A) e com dois esporocistos (B) encontrados nas fezes de cães experimentalmente infectados (Técnica de Sheather, 1000x). 27

Figura 4: Lesões macroscópicas observadas nos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum*. (A) Sufusões no duodeno (setas); (B) Placas de Peyer evidentes (elipse); (C) Sufusões na traquéia (setas); (D) Pulmão com petéquias e presença de muco espumoso na entrada da traquéia (seta). 32

Figura 5: Achados histopatológicos nos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum.* (A) Linfonodo Mesentérico (200x); (B) Linfonodo Poplíteo, as setas indicam figuras mitóticas (400x); (C) Tonsilas com degeneração do epitélio (400x); (D) Tonsilas com petéquias (setas, 100x). 35

Figura 6: Achados histopatológicos nos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum.* (A) Mucosa gástrica com infiltrado inflamatório mononuclear (elipse, 200x); (B) Estômago com presença de células inflamatórias linfoplasmocitárias (setas, 400x); (C) Íleo, avanço da Placa de Peyer sobre a mucosa (200x); (D) Cólon com necrose nas vilosidades (100x). 36

Figura 7: Achados histopatológicos nos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum.* (A) Pulmão congesto (100x) e com (B) infiltrado inflamatório peribronquiolar (200x); (C) Baço com hiperplasia de polpa branca com deslocamento periférico da arteríola (setas, 100x); (D) Rim congestão glomerular (setas, 400x). 37

Figura 8: Fotomicrografia de órgãos dos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum*, marcados pela técnica de imuno-histoquímica. (A) Linfonodo pré-escapular (200x) e (B) Linfonodo poplíteo (200x), (C) Esôfago (100x) e (D) Íleo, (E) Cólon (1000x) e (F) Língua com imunomarcações para o parasito (200x). Complexo ABC. 39

Figura 9: Fotomicrografia de órgãos dos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum* marcados pela técnica de imuno-histoquímica. (A) Rim (400x), (B) Pulmão (400x), (C) Pâncreas (400x), (D) Coração (200x), (E) Cérebro (100x) e (F) Cerebelo (400x) com imunomarcações positivas para o parasito. Complexo ABC. 40

Figura 10: Verificação da presença de antígenos de *Neospora caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados. Marcações positivas para *N. caninum*: (A) Esôfago; (C) Estômago; (E) Duodeno. Controles negativos: (B) Esôfago; (D) Estômago; (F) Duodeno. RIFIT, 400x. 42

Figura 11: Verificação da presença de antígenos de *Neospora caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados. Marcações positivas para *N. caninum*: (A) Jejuno; (C) Íleo; (E) Placa de Peyer no íleo. Controles negativos: (B) Jejuno; (D) Íleo; (F) Placa de Peyer. RIFIT, 400x. 43

Figura 12: Verificação da presença de antígenos de *Neospora caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados. Marcação positiva para *N. caninum*: (A) Ceco (100x), (C) Pâncreas (seta, 200x). Controles negativos: (B) Ceco; (D) Pâncreas; (E) e (F) Cólon (200x). RIFIT. 44

Figura 13: Verificação da presença de antígenos de *Neospora caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados. Marcação positiva para *N. caninum*: (A) Coração, (C) Pulmão (seta), (E) Cérebro. Controles negativos: (B) Coração; (D) Pulmão, (F) Cérebro. RIFIT, 200x. 45

Figura 14: Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em amostras de tecidos de cães experimentalmente infectados. Canaleta 1: Marcador de peso molecular (100pb); canaleta 2: Controle positivo; canaleta 3: Controle negativo; canaletas 4 a 20: produtos amplificados de amostras de tecido. 46

Figura 15: Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em amostras de fezes de cães experimentalmente infectados. Linha 1: Marcador de peso molecular (100pb); linha 2: Controle positivo; linha 3 e 4: Produto amplificado de amostra de fezes; linha 5: Controle negativo. 50

Figura 16: Expressão dos genes Nc*SAG*-1 e Nc*SAG*-4 do *Neospora caninum* pela PCR, em membranas cório-alantóides de embriões inoculados em diferentes períodos de incubação. 51

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Relação dos grupos experimentais com os respectivos animais, modo de infecção e período experimental. 16

Tabela 2: Avaliação da eliminação de oocistos pelos cães, dos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4, infectados com ovos inoculados com taquizoítas de *Neospora caninum*. 28

Tabela 3: Titulação dos soros, realizada pela RIFI, dos cães experimentalmente infectados com ovos de galinha inoculados com *Neospora caninum*. 30

Tabela 4: Relação da intensidade de alterações encontradas nos órgãos dos cães experimentalmente infectados com ovos de galinha inoculados com *Neospora caninum,* pelo exame histopatológico. 34

Tabela 5: Relação dos animais e respectivos órgãos positivos pela IHQ. 38

Tabela 6: Relação dos cães e respectivos órgãos positivos pela RIFIT. 41

Tabela 7: Detecção de DNA de *Neospora caninum* pelo Real-time PCR em amostras de tecidos de cães experimentalmente infectados. 47

Tabela 8: Tabela comparativa dos resultados obtidos pelas técnicas de IHQ, RIFIT e Real-Time PCR, na detecção do *Neospora caninum* nos tecidos dos cães experimentalmente infectados. 49

ABREVIATURAS

- **Complexo ABC**: Complexo avidina-biotina-peroxidase
- **CV-1**: Fibroblastos renais de macaco verde africano
- **Dai:** Dias após-infecção ou *days after infection*
- **ELISA**: Ensaio imunoenzimático indireto
- **HD**: Hospedeiro definitivo
- **HI**: Hospedeiro intermediário
- **IHQ**: Imuno-histoquímica
- **Membrana CA**: Membrana cório-alantóide
- **m-RNA**:
- **NAT**: Teste de aglutinação de *Neospora caninum*
- **NC-1:** cepa de *Neospora caninum*
- **PBS**: *Phosphate buffered saline*
- **PCR**: Reação em cadeia pela polimerase
- **RIFI**: Reação de imunofluorescência indireta
- **RIFIT**: Reação de imunofluorescência indireta em tecido
- **SPF**: *Specifc pathogen free*
- **SRD:** Sem raça definida

Infecção experimental em cães com ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) infectados com taquizoítas de *Neospora caninum*

RESUMO- A neosporose é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum,* e causa um grande impacto econômico na pecuária mundial. Sabe-se que muitos mamíferos são considerados hospedeiros intermediários, e que recentemente, foi confirmado o papel das aves no ciclo de vida de *N. caninum* como hospedeiros intermediários. O presente trabalho teve como finalidade estudar o ciclo evolutivo e patogenia de *N. caninum* em cães alimentados com ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus* previamente inoculados com taquizoítas. Realizou-se diariamente o exame de fezes dos animais, pela técnica de flutuação, constatando a presença de oocistos nas fezes a partir de 7 dia após-infecção. Anticorpos anti- *N. caninum* foram pesquisados semanalmente nos cães pela RIFI, sendo observados anticorpos a partir dos 14dai. Semanalmente um cão foi eutanasiado e durante a necropsia observou-se em todos os cinco animais, aumento dos linfonodos mesentéricos e das tonsilas, presença de muco no duodeno e jejuno e hepatoesplenomegalia, com hiperplasia de polpa branca do baço. Pelo exame histopatológico detectou-se reatividade dos linfonodos, lesões no fígado, coração, pulmão, baço e rim. Pelas técnicas de imunoistoquímica, imunofluorescência indireta dos tecidos e no Real-time PCR, observou-se a presença do parasito. Os resultados obtidos apontam que, os ovos embrionados infectados pelo parasito mostraram eficiência como modelo experimental para infectar cães, que eliminaram oocistos nas fezes, mesmo não apresentando sinais clínicos da neosporose. Ademais, os cães infectados apresentaram prematura soroconversão pela prévia administração de bicarbonato de sódio e o uso das técnicas citadas tornou possível a detecção do parasito nos tecidos analisados.

Palavras-chave: *Neospora caninum,* cães, aves, histopatologia, imuno-histoquímica, imunofluorescência indireta em tecidos, PCR.

Experimental infection in dogs with chicken's embryonated eggs (*Gallus gallus domesticus)* infected with *Neospora caninum* tachyzoites

SUMMARY- Neosporosis is a protozoan disease caused by *Neospora caninum* and affects the reproductive system in cattle worldwide. Infection by the parasite has been widely described in mammals, and recently the role of birds in its life-cycle was confirmed as intermediate hosts. This work aimed to study the life cycle of *N. caninum* and the pathogeny in dogs that were fed with embryonated eggs inoculated with tachyzoites. The tested dogs were followed up for oocyst shedding, by flotation technique, and it was detected at 7 days after infection. Antibodies anti-*N. caninum* were detected at 14dai. Once a week, one dog was euthanized and at the necropsy alterations was observed on the mesenteric lymph nodes and tonsils, presence of mucus at duodenum and jejunum portions, and hepatosplenomegaly. At the histopathological examination lymph nodes alterations were noticed ranging from moderate to intense. In addition, there were alterations in liver, heart, lung, spleen and kidney. The parasite was detected by immunochemistry and indirect immunofluorescense tests as well as by Real-time PCR. The results herein presented suggest that inoculated embryonated eggs showed to be an efficient model to infect dogs, because of shedding oocysts, and no clinical alterations. Moreover, the infected dogs presented earlier seroconvertion because of sodium bicarbonate solution administration and the parasite detection in the analyzed tissues was successful by the techniques used.

Key words: *Neospora caninum,* dogs, birds, histopathology, immunochemistry, indirect immunofluorescense in tissues, PCR.

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário parasito intracelular obrigatório, um coccídeo formador de cisto. A doença provocada por esse protozoário foi relatada, inicialmente, em cães na Noruega. Em 1988, o parasito foi identificado, isolado e denominado como *Neospora caninum*. Atualmente, a neosporose é considerada uma das maiores causas de aborto em bovinos no mundo inteiro, além de estar associada à mortalidade neonatal e encefalomielite congênita em bezerros infectados.

O uso de meios de cultivo celular é muito utilizado não só para *N. caninum* como também para outros parasitos. Modelos experimentais de manutenção de *N. caninum in vitro* têm sido realizados em cultura de células Vero e em fibroblastos renais de macaco verde africano. Além dessas técnicas *in vitro,* utiliza-se também a manutenção do parasito *in vivo,* em camundongos, gerbilos e em ovos embrionados de galinha. O uso de ovos tem sido muito utilizado na virologia para produção de vacinas, e avançou para a parasitologia em estudos com *Toxoplasma hominis, Trichomonas vaginalis, T. foetus, Cryptosporidium baileyi* e *Trypanosoma cruzi.* A introdução de modelos experimentais de infecção, para neosporose, em aves iniciou-se com pássaros carnívoros selvagens, mas sem sucesso. Entretanto, o uso de frangos para infecção experimental e ovos embrionados, para manutenção e produção de antígeno mostrou-se viável e mais econômico. A administração de ovos a cães jovens resultou na presença de oocistos do parasito nas fezes. Posteriormente, foi confirmada a participação de galinhas na epidemiologia da neosporose como hospedeiros intermediários naturais, pela presença de anticorpos anti-*N. caninum* em galinhas confinadas e semi-confinadas naturalmente infectadas.

Dessa forma, merece melhor esclarecimento a possível participação das aves domésticas na transmissão de *N. caninum* a outros animais e muitas informações básicas a respeito do parasito, dentre as quais o isolamento das formas sexuadas em células intestinais de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

Neospora caninum é um protozoário, parasito intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae. Estruturalmente, é muito parecido com *Toxoplasma gondii,* pertencente à mesma subfamília de outros coccídios importantes, como *Cystoisospora, Sarcocystis* e *Hammondia* (DUBEY, et al., 1988).

A neosporose é considerada cosmopolita e foi inicialmente identificada em 1984, na Noruega, por BJERKÄS et al., em uma ninhada de cães com encefalomielite, sorologicamente negativos para *T. gondii*. Entretanto, o isolamento do parasito se fez em 1988 por DUBEY et al., em tecidos de cães diagnosticados com toxoplasmose, mas que não condizia com o gênero *Toxoplasma.* McALLISTER et al., em 1998, ao alimentar cães com tecidos de ratos infectados com *N. caninum,* estes eliminaram oocistos nas fezes. Esse fato, comprovadamente, foi a forma evolutiva do protozoário parasito. Dessa forma, os cães foram considerados como hospedeiros definitivos (HD). Recentemente, coiotes (*Canis latrans)* também foram considerados como HD deste parasito (GONDIM et al., 2004).

O parasito possui três formas de infecção: taquizoítas, cistos teciduais (bradizoítas) e os oocistos (esporozoítas). Os taquizoítas, que medem aproximadamente 6 x 2µm, caracterizam-se pela multiplicação rápida intracelular, provocando no hospedeiro intermediário (HI) uma infecção aguda. Os cistos teciduais, normalmente, são arredondados, e seu diâmetro pode ser medido a partir de 107µm. A parede do cisto mede até 4µm de espessura e, no seu interior, são encontrados bradizoítas de 7-8 µm x 2µm de tamanho (DUBEY, 2003). São comumente encontrados no sistema nervoso central dos hospedeiros intermediários, mas já foram encontrados cistos de parede mais fina (0,3-1,0µm) na musculatura de um bovino e de cães naturalmente infectados com parasito semelhante a *N. caninum* (PETERS et al., 2001). Os oocistos, forma resistente do parasito encontrado no ambiente, podem medir 10,6-12,4 µm x 10,6-12,0 µm de tamanho (DUBEY, 2003). Possuem no seu interior dois esporocistos com quatro

esporozoítas cada (DUBEY et al., 1999). Entretanto, oocistos de *T. gondii, Hammondia hammondi, H. heydorni* e de *N. caninum* são morfologicamente semelhantes, e vários grupos de pesquisa sugerem que a morfologia do oocisto não seja uma característica fenotípica significante para diferenciá-los (MUGRIDGE et al., 1999).

Desde a sua descrição, em 1984, a neosporose tem sido alvo de muitas pesquisas no mundo inteiro, principalmente por afetar o sistema reprodutivo de bovinos, causando perdas econômicas na pecuária (DUBEY, 2003). Muitos inquéritos sorológicos foram conduzidos em animais domésticos e selvagens. Foram encontrados anticorpos específicos contra *N. caninum* em bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, búfalos, camelídeos, raposas, lobos, cachorros do mato, guaxinins, gambás, capivaras, cervídeos, mamíferos marinhos, além de cães e de gatos (DUBEY et al., 1999; HIGA et al., 2000; MINEO et al., 2001; GENNARI, 2004; VITALIANO et al., 2004; OSHIRO et al., 2007). Muitos estudos vêm sendo conduzidos em relação ao ciclo biológico da doença e a descrição de novos hospedeiros intermediários experimentalmente infectados, como camundongos, ratos, gerbilos, coelhos, aves carnívoras e frangos, além daqueles já descritos como cães, gatos, bovinos e ovinos (BAKER et al., 1995; DUBEY e LINDSAY, 1996; McALLISTER et al., 1998; FURUTA et al., 2007).

Neospora caninum instala-se nos hospedeiros intermediários no momento em que os oocistos presentes no ambiente, nas pastagens, cochos de alimentação e água, são ingeridos. Os oocistos passam pelo estômago e duodeno, juntamente com o alimento, sofrem a digestão química e enzimática e liberam as formas infectantes na luz do intestino (DUBEY et al., 1999). Os esporozoítas transformam-se em taquizoítas e, num processo de multiplicação nas células epiteliais do intestino, chamado endodiogenia, formam vacúolos que se rompem e novos taquizoítas são liberados para parasitarem outras células. Assim, conseguem atingir a circulação linfática e a sangüínea, e se espalham pelo organismo todo, atingindo até o sistema nervoso central (SHIBAHARA et al., 1999). Os taquizoítas podem se multiplicar rapidamente num processo freqüente de invasão celular, proliferação, lise da célula do hospedeiro e,

conseqüentemente, invasão de células vizinhas. Tudo isso conjugado com eventos imunopatológicos, resultando em lesões necróticas significativas dentro de tecidos lesados (DUBEY e DE LAHUNTA, 1993). Conseqüentemente, ocorre uma enfermidade neuromuscular severa em decorrência da destruição de células neurais, afetando a condutividade nervosa (DUBEY e DE LAHUNTA, 1993). Tanto nas fases aguda como na crônica da infecção, o cérebro é o órgão mais afetado, no qual se pode encontrar a maior parte dos cistos formados pelo protozoário (BARR et al., 1994; McALLISTER et al., 1996; BUXTON et al., 1998). Alguns pesquisadores sugerem que *N. caninum* possa invadir a medula espinhal pelo nervo espinhal e, posteriormente, alcançar o cérebro pelo líquido líquor (SAWADA et al., 1997).

Comparativamente ao ciclo do *T. gondii*, os taquizoítas penetram nas células do felino hospedeiro, formando um vacúolo parasitóforo que o protege dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Ocorre uma intensa multiplicação assexuada até que a célula se rompe e os taquizoítas invadem novas células. Após algumas divisões, o parasito forma um cisto tecidual, em que se encontram os bradizoítas, formas mais delgada que os taquizoítas (HILL et al., 2005). O hospedeiro intermediário, ao ingerir tecido contendo cisto, digere a parede do cisto, liberando os bradizoítas que penetram nas células epiteliais do intestino delgado. Então, iniciam numerosas gerações de ciclos assexuados e sexuados. As formas encontradas no ciclo enteroepitelial são os merontes, que liberam as formas diferenciadas, gametas femininos e masculinos, que se fundem e formam os oocistos (HILL et al., 2005).

Na neosporose, ocorre a fase aguda e a crônica da infecção. Na fase aguda, os taquizoítas multiplicam-se rapidamente, preferencialmente em células mononucleares macrofágicas presentes na corrente sangüínea, possibilitando uma rápida disseminação pelo organismo. Ao se instalarem nos órgãos, o parasito prossegue no mesmo compasso de multiplicação, destruindo o tecido parasitado e instalando uma reação inflamatória, principalmente nos pulmões (COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006). Ao alcançar o cérebro ou tecido esquelético, o parasito volta na forma de bradizoíta (estado de latência), no qual começa a se

agrupar e se multiplicar lentamente, secretando proteínas que impermeabilizam a parede do cisto, impedindo o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro. Contudo, o cisto tecidual acaba se tornando mais uma potente fonte de infecção para os hospedeiros carnívoros (COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006).

Nos bovinos, a transmissão vertical (transplacentária) do protozoário das fêmeas infectadas para seus bezerros é descrita como a principal forma de transmissão num rebanho (DAVISON et al., 1999). A prevalência da infecção não é unicamente explicada pela transmissão vertical, mas também pela ingestão de oocistos presentes no ambiente (FRENCH et al., 1999). No entanto, pode haver outra forma de infecção além das citadas anteriormente. MOSKWA et al. (2007) detectaram DNA de *N. caninum* em colostro de vacas infectadas e soropositivas, implicando na possibilidade da transmissão do parasito pelo colostro. Durante a gestação, as vacas infetadas podem transmitir o parasito pela placenta para os fetos, ocasionando lesões, como encefalites focais, incluindo necrose e inflamação não-supurativa. Recentemente, MACHADO et al. (2007) reproduziram *in vitro* a replicação de taquizoítas de *N. caninum* em células trofoblásticas binucleadas bovinas, sugerindo a participação destas na transmissão intra-uterina do parasito, já que estas células migram, durante o período de gestação para o epitélio uterino pelas conexões coriônicas.

O cérebro é o órgão mais afetado pelo *N. caninum*, contudo muitos fetos, quando abortados, já estão autolisados (PESCADOR et al., 2007). Assim, quando os cães se alimentam de placentas e fetos abortados, naturalmente infectados, eliminam oocistos no ambiente, podendo contaminar cochos de alimentação e água, aumentando a incidência da infecção no rebanho bovino. Até o momento, não se sabe ao certo como e onde ocorre a fase sexuada de *N. caninum* nos hospedeiros definitivos para que haja formação de oocistos.

Quando vacas prenhes se infectam com o parasito, estes alcançam a placenta pela circulação e invadem o septo caruncular maternal no placentoma antes de infectarem as células trofoblásticas fetais e se espalharem (DUBEY et al., 2006), possibilitando a transmissão transplacentária via células trofoblásticas binucleadas, sugerido por MACHADO et al. (2007). A gestação pode ser

interrompida logo no terço inicial, em conseqüência da vulnerabilidade do feto, quando o timo, baço e os linfonodos periféricos ainda estão em formação. Durante o segundo terço da gestação, esses tecidos linfóides começam a reconhecer e responder aos microrganismos, mas ainda não o suficiente para sobreviver à infecção. Esse é o período em que ocorre a maioria dos abortos (BUXTON et al., 2002). No terço final da gestação, os bezerros têm um aumento gradativo da defesa contra patógenos, possibilitando o nascimento. Os animais podem nascer clinicamente normais ou enfraquecidos e se desenvolvem normalmente (BUXTON et al., 2002), mas apresentam as formas latentes do parasito que persistirá por várias gerações e em sucessivas gestações (BJORKMAN et al., 1996).

A neosporose clínica nos cães ocorre em qualquer idade e não tem predileção de sexo ou raça, no entanto muitos casos têm sido descritos nas raças labrador, golden retriever, boxer, greyhound e basset hound. Os casos mais graves da neosporose ocorrem em filhotes congenitamente infectados que apresentam, inicialmente, uma paresia dos membros posteriores e progridem para uma paralisia com hiperextensão rígida. Além da paralisia dos membros posteriores, outras disfunções podem aparecer como dificuldade de deglutição, paralisia de mandíbula, flacidez e atrofia muscular e ainda falência cardíaca (BUXTON et al., 2002). Em cães experimentalmente infectados, ainda não se conseguiu reproduzir os sinais clínicos clássicos da doença.

No Brasil, na última década, muitos estudos têm sido conduzidos para se conhecer a presença de *N. caninum* nos rebanhos de animais de produção, na população canina e em animais selvagens. A existência do agente em nosso país foi relatada em 1996, quando BRAUTIGAM et al., realizou estudo em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo, detectaram a presença de anticorpos anti- *N. caninum.* A partir desses dados, muitos outros estudos foram conduzidos em bovinos, por causa da sua importância econômica no país. A soropositividade nesses animais pode variar de 6,8% a 67,8% em diferentes regiões do Brasil (GENNARI, 2004). Outros métodos de diagnóstico também foram empregados em estudos da neosporose, entre os quais a IHQ, que detectou a presença de taquizoítas e cistos em tecidos de bezerros de um rebanho leiteiro no Paraná

(SANTOS, 2000); a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a qual detectou o DNA do parasito em fetos de bovinos em São Paulo (PAULA et al., 2004); além da histopatologia que demonstrou focos de inflamação não supurativa no cérebro e coração de 22 fetos no Rio Grande do Sul (COBERLLINI et al., 2002). Muitos outros estudos foram realizados com cães, avaliando-se sua importância na epidemiologia da neosporose. A soropositividade dos cães, em cidades do Brasil, atendidos em hospitais veterinários, clínicas particulares, canis, domicílios, região urbana, rural e errantes, varia de 4,29% a 58, 97% (GENNARI, 2004). MINEO (2007) obteve êxito na infecção experimental de cães, ao alimentá-los com cérebro de bovinos experimentalmente infectados com *N. caninum,* e estes, durante os primeiros 40 dias pós-infecção, apresentaram muco nas fezes juntamente com a presença de oocistos. Além de bovinos e cães, os quais têm grande importância na epidemiologia da neosporose, outras espécies também vêm sendo estudadas, tais como gatos, ovinos, caprinos, eqüinos, búfalos, cervídeos, raposas, lobos, cachorros-do-mato, gambás e capivaras (GENNARI, 2004).

2.2. Modelos Experimentais

Os modelos experimentais freqüentemente usados para se estudar as lesões causadas por *N. caninum* nos hospedeiros são os ratos e camundongos; contudo, bovinos, búfalos, cães, ovinos, canídeos selvagens e aves também já foram infectados com o parasito para verificar o potencial como hospedeiros intermediários e as possíveis lesões causadas (McALLISTER et al., 1996; HILL et al., 2001; MINEO et al., 2005; FURUTA et al., 2007; McCANN et al., 2007; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007). Os ratos são comumente usados como modelos laboratoriais para estudo da neosporose, isolamento das formas do parasito em diferentes hospedeiros ou desenvolvimento de vacinas (SAWADA et al., 1997; CANNAS et al., 2003; OMATA et al., 2004). Normalmente, os animais usados são imunodeficientes ou imunossuprimidos em decorrência da ausência de patogenicidade do parasito em ratos de laboratório (RETTINGER et al., 2004). A espécie *Rattus norvergicus* foi apontada como um hospedeiro resistente ao

parasito (LINDSAY e DUBEY, 1990), mas se mostrou susceptível à infecção natural (HUANG et al., 2004). Em 2001, GONDIM et al. comprovaram a eficiência dos gerbilos em desenvolver a infecção após inoculação do parasito, além de produzir grande número de cistos teciduais sem que fossem necessariamente imunossuprimidos. Em búfalos, foi comprovada a presença de DNA de *N. caninum* no sêmen e sangue de búfalos experimentalmente infectados, pela via intravenosa, com taquizoítas do isolado NC-1. A presença do parasito foi intermitente e encontrada em baixa quantidade no sêmen, associada ao estágio crônico da infecção (SERRANO-MARTINEZ et al., 2007). Outra espécie animal utilizada para infecção experimental foi a de ovelhas prenhes, que pariram filhotes enfraquecidos, clinicamente sadios, e outras ainda sofreram abortamentos (McALLISTER et al., 1996).

Além de todos os animais citados acima para infecção experimental de *N. caninum,* as aves também podem ser usadas como modelo. Em 1995, BAKER et al. investigaram o possível potencial de falcões, abutres e corujas como hospedeiros definitivos, entretanto não obtiveram êxito, pois não houve eliminação de oocistos nas fezes das aves. Outras aves que são consideradas potencialmente como hospedeiros intermediários após infecção experimental são os pombos e o diamante mandarino (*Taeniopygia guttata*) (McGUIRE et al., 1999). FURUTA et al. (2007) realizaram infecção experimental em aves domésticas, frangos e em ovos embrionados e puderam constatar a presença do parasito pela IHQ, em amostras de tecidos dos frangos e a potencialidade dos ovos embrionados em propiciar a replicação dos taquizoítas. Assim, sugeriram um novo modelo de estudo da biologia do parasita *in vivo*. Constatou-se também que pintos originados de ovos infectados apresentaram sintomatologia neurológica, como perda da coordenação motora, movimentos de pedalagem e ataxia de membros. Além dos resultados apresentados, cães que foram alimentados com ovos embrionados e membranas cório-alantóide infectados com *N. caninum*, eliminaram oocistos nas fezes. Posteriormente, COSTA et al. (2007) mostraram que as galinhas são consideradas bons HI naturais, ao realizarem sorologia em galinhas semi-confinadas e confinadas e se depararam com uma soropositividade de

23,5% e 1,5%, respectivamente, além de detectarem o DNA do parasito no cérebro das aves soropositivas pela PCR.

O uso de ovos embrionados de galinha tem sido exaustivamente empregado na virologia, principalmente na produção de vacina contra o vírus da Newcastle. Na virologia, o uso dos ovos embrionados oferece várias possibilidades de aplicação. Esta técnica permite uma produção em grande quantidade de vírus, necessários para estudos biofísicos e bioquímicos e para preparação de vacinas e diagnósticos sorológicos. A técnica de inoculação intra-alantóide representa a mais importante e mais freqüente via de inoculação em embriões para produção em larga escala de vírus (BLAŠKOVIČ e STYC, 1967).

Para estudar o isolamento de *T. hominis* (BUTTITA, 1951), desenvolvimento de *Toxoplasma, Trichomonas vaginalis, T. foetus* e *Cryptosporidium baileyi* (WARREN e RUSS, 1948; ROIRON e GALISTIN, 1963; WUNDERLIN et al., 1997), e estudo da biologia de *Trypanosoma cruzi* (MELLO e DEANE, 1976), o uso de ovos embrionados como modelo tem sido empregado há vários anos. Há algumas décadas, a produção de taquizoítas de *T. gondii* em embriões de galinha tornou-se viável, por ser mais econômico e a obtenção de um meio de cultivo naturalmente estéril, além de evitar a eutanásia de animais (WUNDERLIN et al., 1997) .

2.3. Diagnóstico

O método de diagnóstico freqüentemente usado para detecção de anticorpos anti- *N. caninum* é a sorologia, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e teste de aglutinação de *N. caninum* (NAT), quando ocorre a suspeita clínica da neosporose. Em casos de abortamentos em bovinos, pode-se complementar a conclusão do diagnóstico com a histopatologia, entretanto torna-se difícil a identificação dos parasitos, por causa da escassez e da baixa freqüência de lesões macroscópicas (SANTOS, 2000). O emprego da imunoistoquímica permite localizar e identificar o parasito em cortes de tecidos infectados, utilizando soros monoclonal ou policlonal anti-*N. caninum* (LINDSAY e DUBEY, 1989),

confirmando a presença de antígeno, taquizoítas ou cistos, pelo uso do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (SANTOS, 2000). Atualmente, a PCR é uma ferramenta largamente utilizada na detecção do DNA do parasito, entretanto sua eficiência depende das condições do laboratório que efetuará a técnica, do estágio de autólise do material e da manipulação da amostra (DUBEY, 2003). A seqüência alvo mais utilizada é a Nc5 do DNA genômico de *N. caninum,* com modificações na realização da *nested* ou semi-*nested* PCR, o que aumenta a sensibilidade e especificidade da técnica (COLLANTES- FERNÁNDEZ et al., 2002). O Sistema de "Real-time PCR" tem sido utilizado como ferramenta na detecção de DNA do *N. caninum,* pelos sistemas de sonda tipo Taqman®, Plexor™ e Sybr® Green (COLLANTES- FERNÁNDEZ et al., 2002; MÜLLER et al., 2002; GHALMI et al., 2008). Comparativamente, o limite de detecção de DNA dos sistemas Plexor™ e Sybr® Green pode ser afetado por amplificações não-específicas, principalmente quando a quantidade de DNA do parasito é baixa (GHALMI et al., 2008). Para o isolamento do parasito, pode-se recorrer ao cultivo celular do protozoário proveniente de tecidos infectados ou ensaio biológico em animais imunossuprimidos, entretanto pesquisadores recorrem a esta última técnica em estudos de patogenia de *N. caninum* para comprovação da existência do protozoário em algum tecido infectado suspeito.

A transmissão transplacentária de *N. caninum,* em bovinos, é um meio eficiente de o parasito infectar um novo hospedeiro, e isso pode ocorrer em sucessivas gestações e por muitas gerações (INNES, 2007). Os cães se infectam facilmente ao se alimentarem de restos placentários e fetos abortados de bovinos infectados, participando, portanto, da manutenção e eliminação de oocistos no meio ambiente. Outros mamíferos cooperam com o ciclo do parasito, já que esse protozoário pode infectar todo animal de sangue quente. Até o momento, poucos estudos focaram as aves como eventuais portadoras, até mesmo as aves de rapina que se alimentam de pequenos roedores, considerados grandes portadores do parasito.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a dinâmica da infecção de *Neospora caninum* em cães alimentados com ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus* inoculados com taquizoítas.

3.1.1. Objetivos Específicos

a. Realizar a infecção pelo *N. caninum* em ovos embrionados inoculados com taquizoítas do parasito.

b. Verificar a eliminação de oocistos e observar possíveis sinais clínicos da neosporose nos cães durante os 30 dias após-infecção.

c. Observar lesões macroscópicas, pelo exame necroscópico, e microscópico, pelo exame histopatológico, de lesões em tecidos dos cães infectados.

d. Detectar a presença do parasito nos tecidos dos cães experimentalmente infectados por *N. caninum* por meio das reações de imuno-histoquímica e da reação de imunofluorescência indireta em tecido.

e. Pesquisar semanalmente, anticorpos anti-*N. caninum,* nos soros dos cães infectados, bem como a detecção direta de DNA do parasito por meio da PCR e “Real-time PCR”, em todas as porções do intestino e outros tecidos, e nos oocistos eliminados nas fezes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra de *Neospora caninum* (NC-1)

Utilizaram-se taquizoítas de *N. caninum* do isolado NC-1[1] (DUBEY et al., 1988) cultivados em células CV-1 (fibroblastos renais de macaco verde africano). As células CV-1 infectadas e não infectadas foram cultivadas a 37°C em 5% de CO_2, utilizando meio RPMI 1640 (Sigma Co., EUA), contendo 10% de soro fetal bovino, até atingirem a confluência, quando foram infectadas com células CV-1 parasitadas, contendo de $5x10^5$ a 10^6 taquizoítas. Após 10 dias da infecção celular, a maioria delas ficou destruída, e grande número de taquizoítas concentrava-se no sobrenadante. Este foi colhido, passado em seringa com agulha para a liberação dos parasitos intracelulares restantes, recolhidos em tubos cônicos e centrifugados a 4000x*g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de PBS. A suspensão de taquizoítas resultante do cultivo foi utilizada para infecção de novos frascos de cultivo, preparo de antígeno formolizado para preparação de lâminas a serem utilizadas na RIFI e preparo do inóculo para a infecção dos ovos. A preparação do inóculo realizou-se a partir do sedimento formado pela centrifugação, sendo este ressuspenso em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Co., EUA), adicionado de solução antibiótico/antimicótico com penicilina (10000 U), estreptomicina (100µg) e anfotericina B (25µg) por mL (Invitrogen, EUA). Os procedimentos descritos foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP.

4.2. Infecção experimental de ovos embrionados de galinha (SPF) com taquizoítas de *N. caninum*

Ovos embrionados de galinha, livres de agentes patogênicos (SPF)[2], foram inoculados via cavidade alantóide, no oitavo dia de incubação, com uma suspensão contendo $5,04x10^6$ taquizoítas de *N. caninum.* Esta solução de

[1] Amostra gentilmente cedida pela Profa. Dra. Solange Maria Gennari da FMVZ – USP, São Paulo.
[2] Gentilmente cedidos pela Hyline do Brasil.

taquizoítas foi diluída em solução salina com fosfatos (PBS, 0,01M, PO_4 = 0,14M, NaCl pH 7,2) contendo 1% de solução penicilina/estreptomicina/anfotericina B. Os ovos foram, a seguir, incubados em incubadora rotativa à temperatura (37°C) e umidade (60%) controladas. A viabilidade dos ovos pós-infecção foi observada diariamente, durante sete dias, por meio da ovoscopia. Após 7 dai, doze ovos foram deixados na incubadora até a eclosão, e o restante dos embriões e seus anexos foram retirados das cascas para certificação da presença de taquizoítas na membrana cório-alantóide por exame direto, com auxílio de um microscópio binocular (Nykon, Alphaphot-2 YS2). Depois da confirmação da presença do parasito pelo exame direto, os embriões e anexos foram utilizados na infecção peroral dos cães. Os embriões que morreram após primeiras 72 horas após a infecção, foram descartados e não foram oferecidos aos cães.

4.3. Origem e manutenção dos cães

Todos os cães SRD, utilizados neste trabalho foram oriundos de fêmeas prenhes errantes encontradas nas dependências da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV). As fêmeas, assim como seus filhotes, foram alojados em baias individuais do canil do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP Jaboticabal. Todos os animais foram vacinados contra cinomose, parvovirose, leptospirose, parainfluenza, hepatite infecciosa e coronavirose. Foram vermifugados (Praziquantel, Pamoato de Pirantel e Pamoato de Oxantel, 10mg/kg) e tratados com droga giardicida (Metronidazol, 10mg/kg, BID, durante 5 dias). Adicionalmente, cada animal foi submetido à detecção de anticorpos anti-*Babesia canis,* anti-*Ehrlichia canis,* anti-*T. gondii,* anti-*N. caninum e* anti-*Leishmania chagasi,* com o objetivo de utilizar animais soronegativos para os agentes etiológicos supracitados. Além dos referidos cuidados, foi assegurada uma dieta baseada em ração comercial (Dog Chow®, Purina®), sem a possível ingestão de carne crua ou qualquer outro tipo de alimento, para evitar possível infecção por outros coccídios. Diariamente, era realizada a desinfecção do canil, com uso de solução de formaldeído a 1% e hipoclorito de sódio a 2%.

4.4. Infecção experimental dos cães

Antes de cada protocolo experimental, realizou-se o vazio sanitário do canil por um período de um mês, com desinfecção com solução de formaldeído a 1% e hipoclorito de sódio a 2%, para descartar a possibilidade de infecção cruzada com outros coccídios.

Nos quatro ensaios realizados, utilizaram-se cães SRD, com idade de três a seis meses, nascidos e mantidos no canil do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV- UNESP Jaboticabal.

a. Grupo experimental 1

Esse experimento foi realizado em um cão (cão A) jovem de seis meses de idade, infectado per os com cinco membranas cório-alantóide infectadas com taquizoítas de *N. caninum* (NC-1), fornecidas ao animal misturadas à ração comercial. O período experimental foi de 30 dias.

b. Grupo experimental 2

Foi realizado em dois cães (cães B e C) com cinco meses de idade, os quais receberam dois ovos infectados durante quatro dias consecutivos.

c. Grupo experimental 3

Foi realizado em quatro cães (cães D, E, F e G) de três a quatro meses de idade, os quais receberam dois ovos infectados, por dia, durante três dias consecutivos. O mesmo procedimento repetiu-se aos 15 e aos 30 dai, perfazendo 90 dias de experimento.

d. Grupo experimental 4

Foi realizado em cinco cães de três meses de idade, sendo um animal considerado controle negativo do experimento. Aos animais do grupo infectado (cães 2, 3, 4 e 5), foram fornecidos cinco ovos infectados durante três dias consecutivos. Ao animal controle (cão 1) também foram oferecidos ovos, porém não infectados. Quinze minutos antes da ingestão dos ovos pelos animais, foram administrados por via oral, 5 mL de solução de bicarbonato de sódio 10%, objetivando alcalinizar o pH estomacal, para que os parasitos não fossem inviabilizados pela ação do suco gástrico. A cada 7 dai um animal foi eutanasiado, sendo o período de experimento de 30 dias.

O exame clínico dos cães foi feito diariamente e consistiu em aferir os batimentos cardíacos, freqüência respiratória, e a palpação dos órgãos na cavidade abdominal e dos linfonodos submandibular, pré-escapular e poplíteo.

Nenhum dos animais dos ensaios 1, 2 e 3 foram eutanasiados, e todos os procedimentos realizados com os cães estavam de acordo com os princípios éticos em pesquisa com animais de laboratório, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o experimento foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA, protocolo nº 005325-07).

A distribuição dos grupos experimentais com seus respectivos animais e período de infecção estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Relação dos grupos experimentais com os respectivos animais, modo de infecção e período experimental.

Grupo / Animal		Idade (Meses)	Modo de infecção	Período Experimental (dias)
G1	A	6	5 membranas cório-alantóides	30
G2	B C	5	8 ovos inteiros em 4 dias (2 ovos/dia)	35
G3	D E F G	3-4	6 ovos inteiros em 3 dias (2 ovos/dia) Repetição aos 15 dpi e 30 dpi (2 ovos/dia)	90
G4	1* 2 3 4 5	3	6 ovos inteiros em 3 dias (2 ovos/dia)	30

*Animal controle: receberam os dois ovos inteiros por três dias, porém não infectados com *Neospora caninum.*

4.4.1. Exames coprológicos

Após a infecção dos cães em todos os ensaios, foi realizado, diariamente, o exame de fezes pelo método de flutuação com solução de sacarose (densidade de 1,26 g/cm^3), pelo Método de Sheather (BENBROOK e SLOSS, 1965) modificado, para identificação de oocistos tipo *N. caninum.* Dez gramas das fezes colhidas foram misturados à solução de sacarose, filtrados por uma gaze e centrifugados a 735x*g* por 10 minutos. Apenas 20µL do menisco foram retirados para observação de oocistos tipo *N. caninum* em microscópio óptico. Outros 5 mL do sobrenadante foram adicionados a 10 mL de água destilada e centrifugados por 10 minutos a 735x*g*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de água destilada e armazenado a -20ºC até ser analisado por métodos moleculares.

4.4.2. Exames sorológicos

De cada animal (grupos experimentais 1, 2, 3 e 4) foi coletado sangue por venopunção da jugular para obtenção de soro, a cada 7 dias, durante 30 dias consecutivos. Os soros foram mantidos a uma temperatura de -20ºC até a sua utilização para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI.

4.4.3. Exame Necroscópico e Exame Histopatológico

Apenas os cães do grupo experimental 4 (cães 1, 2, 3 e 4) foram eutanasiados para o estudo do ciclo sexual do parasito no intestino delgado de cães experimentalmente infectados.

A um intervalo de sete dias, um animal foi eutanasiado por um período de 30 dias. A eutanásia dos animais deu-se pela administração de Tiopental 2,5% (0,5 mL/kg), seguido de solução saturada de cloreto de potássio, por via endovenosa. O exame *post mortem* foi realizado com a finalidade de observar a presença do parasito, em todos os órgãos, possíveis alterações macroscópicas associadas a *N. caninum.* A seguir, procedeu-se a coleta de vários fragmentos de órgãos, a saber: linfonodos submandibular, pré-escapular, mesentérico e poplíteo; tonsilas, esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon, vesícula e ducto biliar, língua, coração, pulmão, fígado, baço, rim, pâncreas, cérebro e cerebelo.

Uma parte dos fragmentos foi estocada a -70ºC, para posterior detecção do DNA de *N. caninum* pela PCR. Outra parte dos fragmentos coletados foi fixada em solução de formalina tamponada a 10%, por 48 horas, e transferidas para solução de álcool etílico 70%.

As amostras dos tecidos fixadas em solução de álcool etílico 70% foram processadas conforme rotina convencional de processamento histológico, com desidratação em diluições crescentes de álcool etílico e diafanização em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica. Os cortes com 4µm de espessura foram feitos em micrótomo e colocados em lâmina de microscopia, as quais foram previamente tratadas com Poly-L-Lisina (Sigma P-1399), diluída a 0,01%, para manter o corte aderido à lâmina. As lâminas com os cortes foram mantidas em estufa a 60°C, por uma hora, e submetidas à desparafinização em xilol e reidratação em diluições decrescentes de álcool etílico. Os fragmentos nas lâminas foram corados conforme técnica de hematoxilina-eosina; e na análise microscópica dos órgãos colhidos à necropsia, foi observada a presença de lesões degenerativas e/ou inflamatórias, considerando a intensidade dessas alterações (discreta, moderada e acentuada).

4.5. Detecção de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI

4.5.1. Preparação das lâminas

Os taquizoítas oriundos do cultivo *in vitro* foram submetidos à centrifugação a 600x*g* por 10 minutos a 4ºC. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo os parasitos, foi lavado por três vezes em 10 mL de PBS. O precipitado foi ressuspenso em PBS contendo 1% de formol, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante para que houvesse a fixação e preservação dos antígenos de superfície dos taquizoítas. Após essa etapa, retirou-se o excesso do tampão fixador com três ciclos de lavagens e ressuspendeu-se o precipitado com água bidestilada, adicionada de 1% de soro albumina bovina (BSA). A concentração de taquizoítas foi estabelecida em 20-30 parasitos por campo e, então, 10µL da suspensão foram

adicionados a cada poço das lâminas. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, envoltas individualmente em lenços de papel, embaladas em papel laminado e armazenadas a -20ºC.

4.5.2. Reação de imunofluorescência indireta

A reação foi realizada de acordo com técnicas previamente descritas (MINEO et al., 2001), para detectar anticorpos da classe IgG. Os soros foram diluídos em PBS, na diluição inicial de 1:25, e 10µL de cada amostra foram depositados em cada poço das lâminas. Estas foram incubadas a 37ºC, por 30 minutos, em câmara úmida, seguido de três lavagens de 5 minutos cada em PBS. Em seguida, as lâminas foram secas e adicionaram-se 10µL do anticorpo anti-IgG canino conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-Sigma, F4012), na diluição de 1:350. O anticorpo foi diluído em PBS com 0,01% de Azul de Evans. Incubaram-se novamente as lâminas a 37ºC, por 30 minutos, seguido de novas lavagens e montagem das lâminas com lamínulas e glicerina tamponada com bicarbonato de sódio, pH 9,0. A leitura das lâminas foi feita em microscópio equipado com luz fluorescente (Olympus Mod. BX60, Tokyo, Japão). Considerou-se reação positiva a fluorescência total da superfície dos taquizoítas.

4.6. Reação de Imuno-histoquímica

Utilizou-se o mesmo protocolo de IHQ empregado por MINEO et al. (submetido para publicação). Cortes incluídos em parafina obtidos foram utilizados na realização da técnica de IHQ, empregando o complexo avidina-biotina peroxidase (ABC), utilizando-se o kit DakoCytomation, Dinamarca. As lâminas foram incubadas em estufa a 60°C, por 30 minutos, passaram pelo processo de desparafinização, conforme descrição no item 4.6. e, então, foram submetidas a três lavagens de 5 minutos com PBS, pH 7,2. Prosseguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena, com solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio a 2%, por 20 minutos em ambiente escuro, e um novo ciclo de três lavagens com PBS foi realizado. A recuperação antigênica foi realizada em solução tamponada

de citrato, pH 6,0, em panela de pressão, sob pressão constante, por 5 minutos. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram deixadas em repouso na temperatura ambiente por 20 minutos e prosseguiu-se com 3 lavagens com PBS, pH 7,2. Para o bloqueio da proteína inespecífica utilizou-se o "Protein Block" (DakoCytomation, Dinamarca), por 20 minutos, antecedendo a adição de soro policlonal de bovino anti-*N. caninum* na diluição de 1:1000, incubando as lâminas em câmara úmida, por 18 horas, a 4°C. Após essa etapa, as lâminas foram submetidas a três lavagens, de 5 minutos cada, em PBS. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado (DakoCytomation, Dinamarca), por 30 minutos, com lavagem em PBS. Adicionou-se a estrepto-avidina/peroxidase (DakoCytomation, Dinamarca) às lâminas, as quais foram incubadas por 30 minutos, antes de serem novamente lavadas com PBS. O cromógeno tetrahidrocloreto de diaminobenzidine (DAB) (DakoCytomation, Dinamarca) foi adicionado, segundo recomendações do fabricante e, em seguida, realizada uma lavagem com água destilada. Após a coloração com hematoxilina de Harris, os cortes foram imersos rapidamente em soluções crescentes de álcool e xilol, antes de serem montados com Bálsamo do Canadá (Synth).

Realizou-se também a IHQ das membranas cório-alantóide dos ovos infectados para certificação da presença do parasita.

4.7. Reação de Imunofluorescência Indireta em Tecidos

A técnica utilizada foi preconizada por Machado (2006, não publicado). Os cortes parafinados foram mantidos em estufa a 60°C durante trinta minutos. Após essa etapa, foram realizados os procedimentos de desparafinização e reidratação, conforme descrito anteriormente. As lâminas passaram por três lavagens de 5 minutos com PBS e submetidas à recuperação antigênica com solução tamponada de citrato (pH 6,0), conforme descrito anteriormente. Após estabilização da temperatura, fez-se uma lavagem em água destilada e três lavagens com PBS, pH 7,2. Adicionou-se aos cortes soro policlonal (soro de bovino positivo para *N. caninum*) diluído, na concentração de 1:80. Após um

período de 2 horas de incubação a 37ºC, em câmara úmida, as lâminas foram lavadas por três vezes em PBS. Em seguida, adicionou-se conjugado de coelho anti-IgG de bovino (Sigma Co., EUA) acoplado ao isotiocianato de fluoresceína, na diluição 1:50. As lâminas foram novamente mantidas a 37°C, por 2 horas, e procedeu-se a nova série de lavagens em PBS. As lâminas foram montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 9,0) e observadas em microscópio equipado com luz ultravioleta (Olympus Mod. BX60, Tóquio, Japão). Utilizaram-se como controle da reação, as membranas CA dos ovos infectados, juntamente com soros, sabidamente, positivo e negativo de bovino para *N. caninum*. Realizou-se também a RIFIT nas membranas cório-alantóide dos ovos infectados oferecidos aos cães.

4.8. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela Reação em Cadeia pela Polimerase

4.8.1. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em fragmentos de tecidos de cães experimentalmente infectados

Fragmentos de tecidos colhidos durante a necropsia foram mantidos a -70ºC para posterior processamento e detecção de DNA de *N. caninum* pela técnica da PCR.

A extração do DNA das amostras de tecidos dos cães infectados foi realizada a partir de fragmentos de 25 mg, usando-se o kit DNA (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagem®, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Utilizou-se o DNA de taquizoítas de *N. caninum* do cultivo celular como controle positivo da PCR. Para a detecção do DNA de *N. caninum*, pesquisou-se um fragmento do gene de 328 pares de base (bps), utilizando-se os iniciadores Np6 (5'CAGTCAACCTACGTCTTCT-3') e Np21 (5'- GTGCGTCCAATCCTGTAAC3'). As reações da amplificação foram realizadas com volume final de 25 µL: 5 µL de cada amostra de DNA, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 mM de MgCl2, 200 mM de mistura de dNTPs e Taq polimerase (Invitrogen 1U/reação), completando o volume com água destilada ultrapura. As amplificações foram

processadas em um termociclador PTC-200 (MJ Research) com 40 ciclos programados para desnaturação (94ºC/1 minuto), anelamento (50ºC/1 minuto) e extensão (74ºC/3,5 minutos).

Após as reações de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo, em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0). Um volume de 10µL de cada amostra, acrescido de 2µL de tampão de amostra, (glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%) foi aplicado nas canaletas do gel. A corrida eletroforética foi realizada a 90 V, durante 80 minutos, e os produtos da PCR foram visualizados e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados por um analisador de imagens acoplado (Eagle Eye II, Stratagene).

4.8.2. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pelo "Real-time PCR" em fragmentos de tecidos de cães experimentalmente infectados

Utilizou-se o kit DNA (Promega- Wizard SV Genomic DNA Purification System, cat. A2360), de acordo com as recomendações do fabricante, para a extração de DNA das amostras de tecidos do animal controle negativo e de cães experimentalmente infectados. Empregou-se o sistema SYBR® Green, e as seqüências de oligonucleotídeos foram NC5-F1 (AAA CAG GAG GAG AGA ACG GCG ATT) e NC5-R1 (AGT ACG CAA AGA TTG CCG TTG CAG). Empregou-se para a reação uma placa de 96 cavidades, na qual foram adicionados 13µL do Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG com ROX, 1 µL de cada *primer*, NC5-F1 e NC5-R1, e as quantidades de água bidestilada estéril e dos DNAs das amostras dos tecidos foram corrigidas de acordo com a concentração protéica obtidas das amostras. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Após a pipetagem de todos os reagentes, a placa foi selada e colocada no termociclador para iniciar a abertura da fita de DNA à temperatura de 50ºC, por 2 minutos, e 95ºC por 10 minutos. O ciclo de amplificação foi repetido 40 vezes, durante as quais a desnaturação ocorreu a 95 ºC/30 segundos, o anelamento a 60 ºC/30 segundos e a extensão a 72 ºC/1 minuto. As reações foram repetidas três vezes, em dias diferentes, para certificar a reprodutibilidade da técnica.

4.8.3. Detecção de DNA nos oocistos de *Neospora caninum* pela PCR, em fezes de cães experimentalmente infectados

Utilizou-se o kit DNA (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagem®, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, para a extração de DNA das amostras de fezes dos cães experimentalmente infectados. Empregou-se o DNA de taquizoítas de *N. caninum* do cultivo celular como controle positivo da PCR e, como controle negativo, foi utilizado água ultrapura (Gibco). Foi realizado o mesmo protocolo descrito anteriormente.

4.8.4. Detecção de RNA mensageiro (m-RNA) dos genes Nc*SAG*-1 e Nc*SAG*-4 na membrana CA dos embriões inoculados

Realizou-se a extração de RNA das membranas CA dos embriões inoculados pelo Qiagen RNeasy Mini Kit, de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 3µL de RNA total foi utilizada na síntese do DNA complementar (cDNA). A síntese foi promovida pela enzima transcriptase reversa ImProm II® (Promega, EUA), utilizando-se como iniciador um oligonucleotídeo poli-T (Oligo dT primer, Invitrogen, EUA).

Fez-se uma mistura de 3 µL de RNA total, 1 µL de água-DEPC e 1µL de oligo dT (0,5 µg/ µL), que foram incubadas a 70ºC por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se o segundo mix da reação com 4 µL de tampão 5x, 2,4 µL de $MgCl_2$ (1,2mM), 1 µL (40 U/µL) de inibidor de RNAse (RNAse OUT, Invitrogen, EUA), 1 µL de dNTPs (25mM), 1 µL (200u/µL) de enzima transcriptase reversa. As amostras foram transferidas ao termociclador permanecendo por 4°C/5 minutos; 25°C/5 minutos; 42°C/60 minutos e 70°C/15 minutos. Ao término, as amostras de cDNA foram armazenadas -20°C, anterior à reação de PCR, específica para cada gene.

A verificação da interconversão de fases de taquizoítas para bradizoítas nas membranas CA dos embriões inoculados com *N. caninum,* foi observada pela expressão de dois genes, o Nc*SAG*-1 (5'- GCA AGG AGA TAC CGT TGG AA-3'; 5'- GTT TGC ACC GTA AGA GCA CA 3'), gene específico para taquizoíta, e o Nc*SAG*-4 (5'- CAA GTT CTC AGG GCT TCG TC- 3'; 5'- CGA TGC AAA AGC AAG

AGC TG- 3'), específico para bradizoíta. As amplificações foram processadas em um termociclador PTC-200 (MJ Research) com 40 ciclos programados para desnaturação (94ºC/1 minuto), anelamento (50º a 62º C/1 minuto) e extensão (72ºC/2 minutos), com "hot start" de 94ºC/5 minutos e extensão final de 72ºC/5 minutos. Empregou-se taquizoítas de *N. caninum* do cultivo celular como controle positivo da reação.

5. RESULTADOS

5.1. Inoculação de taquizoítas de *Neospora caninum* em ovos embrionados

Verificou-se, por meio da ovoscopia diária, que alguns embriões após a inoculação com taquizoítas de *N. caninum* não resistiram à infecção no decorrer dos 7dai. Os embriões sobreviventes a partir do sétimo dia de inoculação, correspondendo a 15 dias de vida do embrião, foram abertos e neles verificou-se a presença de taquizoítas (Figura 1) na membrana CA. Todos os ovos utilizados na infecção peroral dos cães foram certificados da presença dos parasitos vivos. Após a visualização dos parasitos em microscópio óptico, fragmentos da membrana CA, submetidos aos ensaios de IHQ, RIFIT e exame histopatológico para a detecção dos parasitos de *N. caninum,* foram positivos (Figura 2).

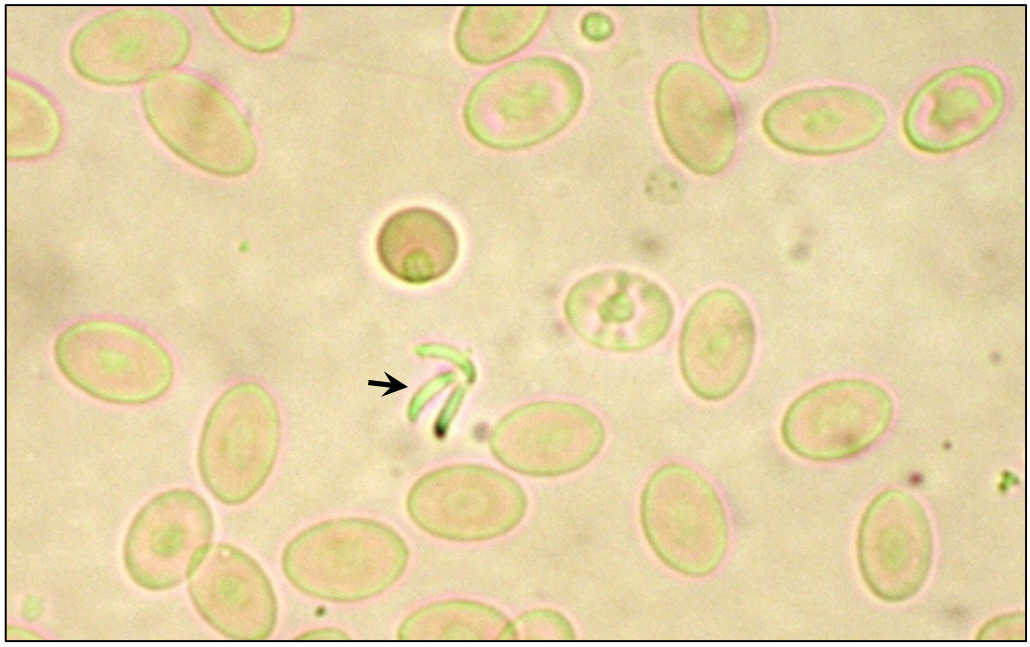

Figura 1: Taquizoítas (seta) de *Neospora caninum* encontrados em estiraços de membrana cório-alantóide de ovos de *Gallus gallus domesticus* inoculados experimentalmente com a cepa NC-1 após 7dias após infecção. A fresco. 400x.

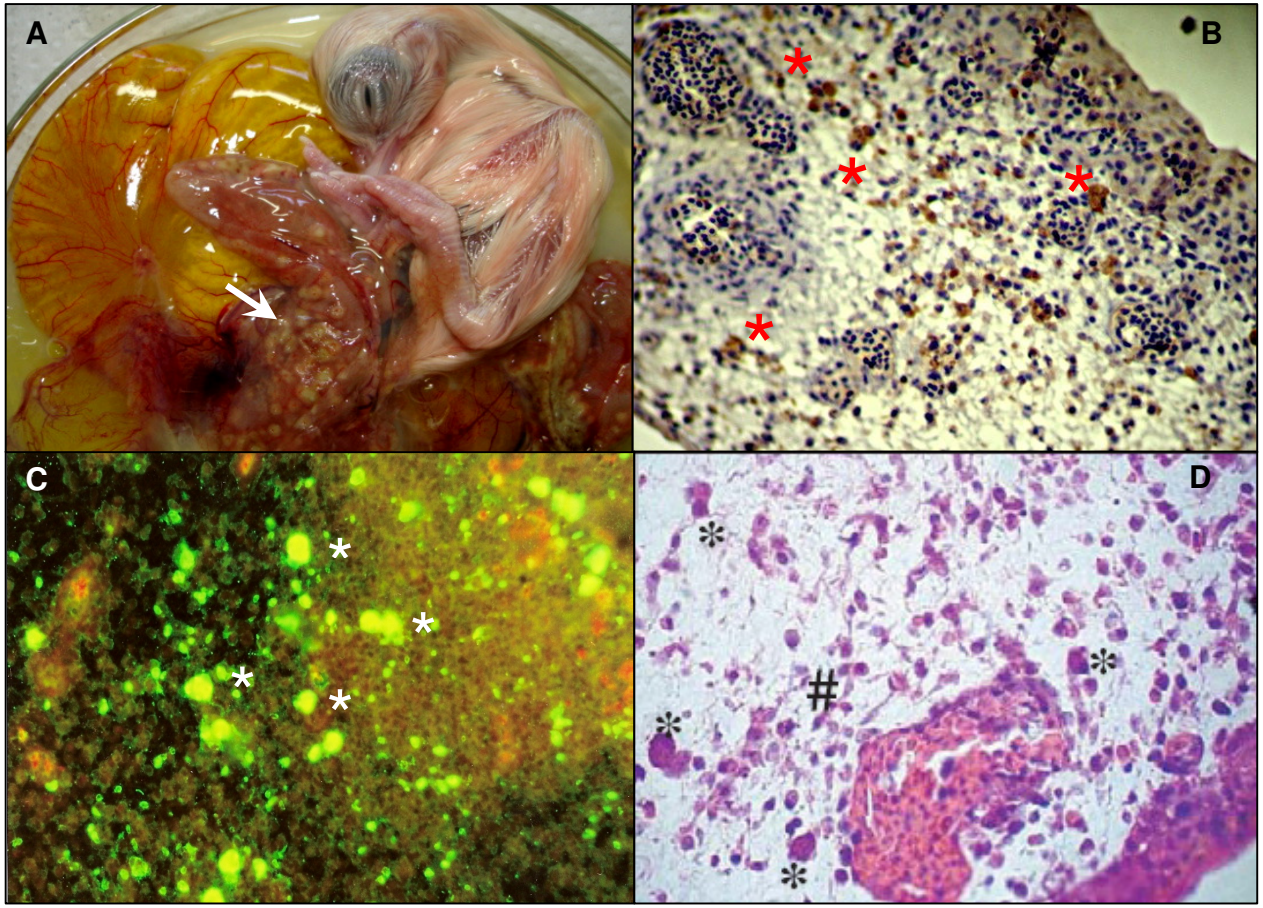

Figura 2: Embrião de galinha experimentalmente infectado com *Neospora caninum.* (A) Lesões macroscópicas amarelo-esbranquiçadas (seta branca) na membrana cório-alantóide; (B) Imunomarcações do parasito na membrana CA pela imuno-histoquímica (*, 200x); (C) Marcações fluorescentes do parasito na membrana CA (RIFIT, 200x, *); (D) Presença do parasito na membrana CA (*) com presença de infiltrado inflamatório misto (coloração de hematoxilina-eosina, #, 200x).

5.1. Infecção experimental dos cães

No grupo experimental 1, não foi observada nenhuma alteração digna de nota em relação às fezes e sinais clínicos da doença. Enquanto nos grupos experimentais 2, 3 e 4, os cães apresentaram, nos primeiros quatro dias após-infecção, diarréia pastosa e escura, por causa da ingestão dos embriões e seus anexos. Constatou-se a presença de uma maior quantidade de muco nas fezes no período de liberação de oocistos de cada animal.

Os cães utilizados neste trabalho não apresentaram os sinais clínicos característicos da neosporose, tais como paresia dos membros posteriores e paralisia progressiva com hiperextensão rígida. Não foi constatada hipertermia e/ou linfadenopatia nos exames clínicos realizados diariamente.

5.1.1. Exame coprológico

O exame de fezes foi realizado diariamente, antes e após a administração de ovos infectados aos cães. Pelo método de flutuação em solução de sacarose (Método de Sheather) verificou-se:

- Grupo experimental 1: presença de oocistos nas fezes a partir dos 10dai até os 15dai;
- Grupo experimental 2: neste grupo, somente o cão B liberou oocistos apenas no 34dai; nas fezes do cão C não foram encontrados oocistos do parasita;
- Grupo experimental 3: não houve liberação de oocistos até o 90dai nos cães D, E, F e G;
- Grupo experimental 4: a detecção de oocistos nas fezes dos animais nesse grupo experimental começou a partir do 7dai no cão 2 e, nos demais, a partir do 11dai. A eliminação de oocistos nas fezes dos animais desse grupo foi flutuante e não constante até o final do experimento (Tabela 2). Os oocistos encontrados eram não esporulados e com dois esporocistos no interior (Figura 3).

Tabela 2: Avaliação da eliminação de oocistos pelos cães, dos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4, infectados com ovos inoculados com taquizoítas de *Neospora caninum*.

Grupos	G1	G2		G3				G4				
Dias após-infecção	Cão A*	Cão B	Cão C	Cão D**	Cão E**	Cão F**	Cão G**	Cão 1***	Cão 2*	Cão 3*	Cão 4*	Cão 5*
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+
12	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
13	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
15	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
31		–	–	–	–	–	–					
32		–	–	–	–	–	–					
33		–	–	–	–	–	–					
34		+	–	–	–	–	–					
35		–	–	–	–	–	–					

* Observados até 30 dai.
**Observados até 90 dai sem eliminações de oocistos nas fezes.
***Cão controle negativo.

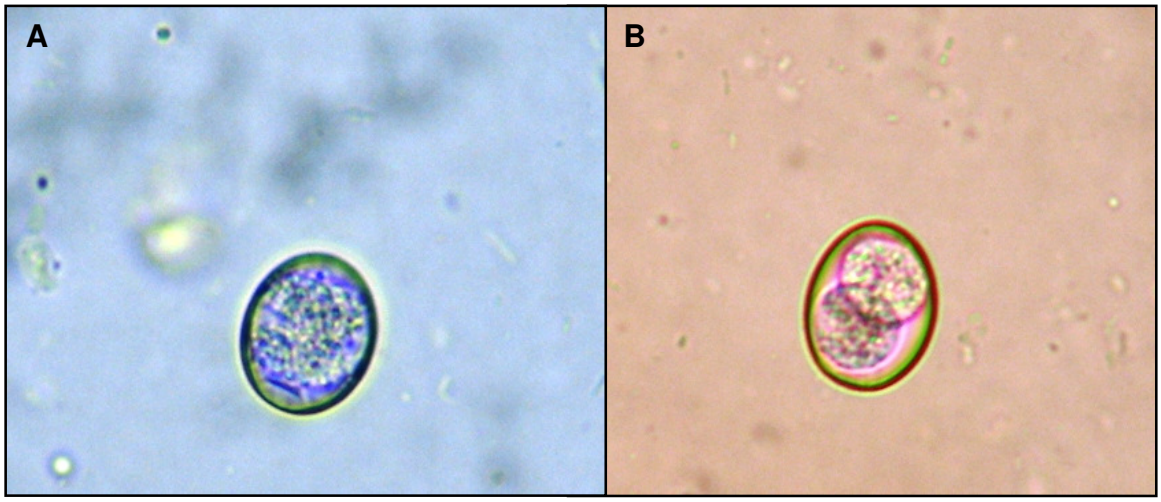

Figura 3: Oocistos de *Neospora caninum* não esporulado (A) e com dois esporocistos (B) encontrados nas fezes de cães experimentalmente infectados (Técnica de Sheather, 1000x).

5.1.2. Exames sorológicos

Não houve soroconversão nos cães do primeiro e segundo grupo experimental até os 30dai. Entretanto, no terceiro grupo experimental a soroconversão ocorreu nos 45dai, com títulos variando de 1:25 a 1:400; e no quarto grupo, três dos quatro cães infectados apresentaram reação positiva ao antígeno de *N. caninum* aos 14dai. O cão 3 apresentou títulos de anticorpos da classe IgG a partir da segunda semana de infecção, com título máximo de 1:800, enquanto os animais 4 e 5 apresentaram títulos de 1:50 e 1:100, respectivamente.

O cão 4, na terceira semana de infecção, apresentou queda na produção de anticorpos, decrescendo o título para 1:25. O animal 5 apresentou decréscimo na terceira semana, com título de 1:50 e aumento na semana seguinte para 1:200. O animal 1, controle negativo do experimento, não apresentou anticorpos detectáveis (Tabela 3).

Tabela 3: Titulação dos soros, realizada pela RIFI, dos cães experimentalmente infectados com ovos de galinha inoculados com *Neospora caninum*.

dai / Animal	dai							
	0	7	14	21	28	30	45	90
Cão A	–	–	–	–	–	–	*	*
Cão B	–	–	–	–	–	–	*	*
Cão C	–	–	–	–	–	–	*	*
Cão D	–	–	–	–	–	–	1:100	–
Cão E	–	–	–	–	–	–	–	–
Cão F	–	–	–	–	–	–	1:25	–
Cão G	–	–	–	–	–	–	1:400	–
Cão 1	–	–	*	*	*	*	*	*
Cão 2	–	–	*	*	*	*	*	*
Cão 3	–	–	1:800	*	*	*	*	*
Cão 4	–	–	1:50	1:25	*	*	*	*
Cão 5	–	–	1:100	1:50	1:200	*	*	*

(–) Amostras negativas
*Término do experimento

5.2. Alterações macroscópicas dos órgãos e tecidos à necropsia

Não houve nenhuma morte natural pela infecção do parasito dos 12 cães utilizados neste trabalho. Nos cães do experimento 4, a cada 7 dias após-infecção, um dos quatro animais infectados, foi submetido à eutanásia.

As alterações macroscópicas observadas estão descritas a seguir:

- Cão 2 (7dai): aumento dos linfonodos mesentéricos; sufusões no duodeno e jejuno, evidenciação das Placas de Peyer, na porção do jejuno (Figura 4A-B) e hiperplasia de polpa branca no baço.
- Cão 3 (14dai): aumento dos linfonodos mesentéricos e tonsilas; a porção final do duodeno apresentou pontos hemorrágicos, assim como no jejuno, a partir do terço médio, e hiperplasia de polpa branca no baço.
- Cão 4 (21dai): presença de líquido na cavidade abdominal, aumento das tonsilas e linfonodos mesentéricos; pulmão em padrão "tabuleiro de xadrez", em virtude das áreas vermelho-escuras e hipocreptantes em todos os lobos (Figura 4D), com pontos hemorrágicos e conteúdo espumoso presente na luz traqueal; hepatomegalia com padrão lobular evidente e esplenomegalia com hiperplasia de polpa branca.
- Cão 5 (28dai): aumento dos linfonodos pré-escapulares e tonsilas, pontos hemorrágicos na mucosa traqueal (Figura 4C), intensa hemorragia pulmonar, sufusões em algumas porções do duodeno e jejuno e Placas de Peyer bem evidentes.

Não foi observada nenhuma lesão macroscópica no cão 1 (controle não infectado) no 7 dai, durante o exame necroscópico.

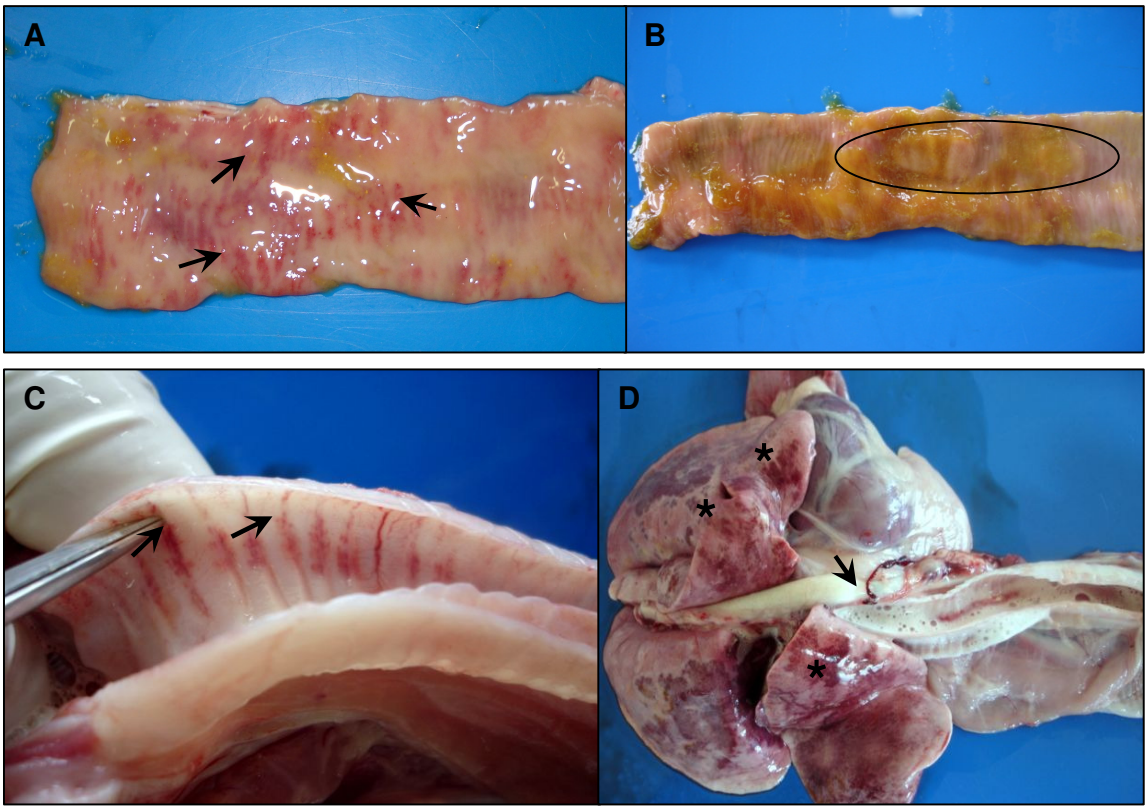

Figura 4: Lesões macroscópicas observadas nos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum*. (A) Sufusões no duodeno (setas); (B) Placas de Peyer evidentes (elipse); (C) Sufusões na traquéia (setas); (D) Pulmão com petéquias e presença de muco espumoso na entrada da traquéia (seta).

5.3. Exame histopatológico

No exame histopatológico, pôde-se observar, nos cães infectados, a reatividade linfóide dos linfonodos submandibular, pré-escapular, mesentérico e poplíteo variando de moderada a intensa. Nos centros germinativos, os linfócitos apresentavam-se degenerados, no entanto as células linfóides, localizadas na zona do manto, estavam em atividade mitótica. Nas tonsilas, ocorreu uma degeneração do epitélio, com áreas de hemorragia e com depleção linfóide (Figura 5).

No trato gastrintestinal, notou-se, a partir do estômago até o fim do trato intestinal, anormalidades que apareceram nos animais 4 e 5, alterações na mucosa, tais como infiltrado inflamatório entre as glândulas de Brunner e/ou criptas de Lieberkühn e edema de submucosa. No duodeno observou-se um infiltrado inflamatório misto, discreto ou moderado, com presença de plasmócitos, linfócitos imaturos e neutrófilos na mucosa, e hiperplasia de células caliciformes. Nas porções seguintes do intestino, jejuno, íleo e ceco, observaram-se acentuada reatividade das Placas de Peyer (Figura 6). Na mucosa do ceco observou-se inflamação discreta próxima às criptas e às glândulas. Na porção final do intestino, a inflamação decresceu, mas ainda observou-se necrose no topo das vilosidades.

No coração do animal 2, observou-se infiltrado de mononuclear (MN) multifocal, principalmente no subepicárdio com eventuais eosinófilos. No fígado, observou-se, nos 4 cães infectados, intensa degeneração vacuolar na região próxima à veia centrolobular, necrose de alguns hepatócitos, congestão nos sinusóides e infiltrado inflamatório focal discreto composto por células mononucleares.

No pulmão dos cães 4 e 5, verificou-se evidente edema e congestão, já nos cães 2 e 3 observou-se espessamento de septo, infiltrado inflamatório moderado peri-bronquiolar e septo-alveolar, sugerindo pneumonia. No baço do animal 2, observou-se hiperplasia de polpa branca com deslocamento periférico da arteríola principal, degeneração no centro dos folículos linfóides e congestão, variando de moderada a intensa. No rim do cão 2, notou-se alterações tais como: congestão glomerular e infiltrado mononuclear disperso na região medular (Figura 7).

No cão 4, observou-se, na língua, infiltrado inflamatório focal composto por células polimorfonucleares. No pâncreas, cérebro e cerebelo, não foi encontrada nenhuma alteração digna de nota. Na tabela 4 estão representadas as intensidades das lesões dos órgãos descritos acima.

Tabela 4: Relação da intensidade de alterações encontradas nos órgãos dos cães experimentalmente infectados com ovos de galinha inoculados com *Neospora caninum,* pelo exame histopatológico.

Órgãos	Cão 1 controle	Cão 2 (7dpi)	Cão 3 (14dpi)	Cão 4 (21dpi)	Cão 5 (28dpi)
Linfonodos Submandibular	-	+	++	+	++
Pré-escapular	-	+	+	++	+
Mesentérico	-	++	++	++	+
Poplíteo	-	+	++	+++	++
Tonsilas	-	+	++	+++	++
Esôfago	-	+	+	+	+
Estômago	-	+	+	+	+
Duodeno	-	+	++	++	++
Jejuno	-	+	+++	+++	+++
Íleo	-	+	+++	+++	+++
Ceco	-	+	++	++	++
Cólon	-	+	++	+	+
Ducto Biliar	-	+	+	+	+
Língua	-	-	-	+	+
Baço	-	-	++	++	++
Rim	-	-		+	+
Fígado	-	++	++	++	++
Pulmão	-	++	+++	+++	++
Pâncreas	-	-	-	-	-
Coração	-	+	-	-	-
Cérebro	-	-	-	-	-
Cerebelo	-	-	-	-	-

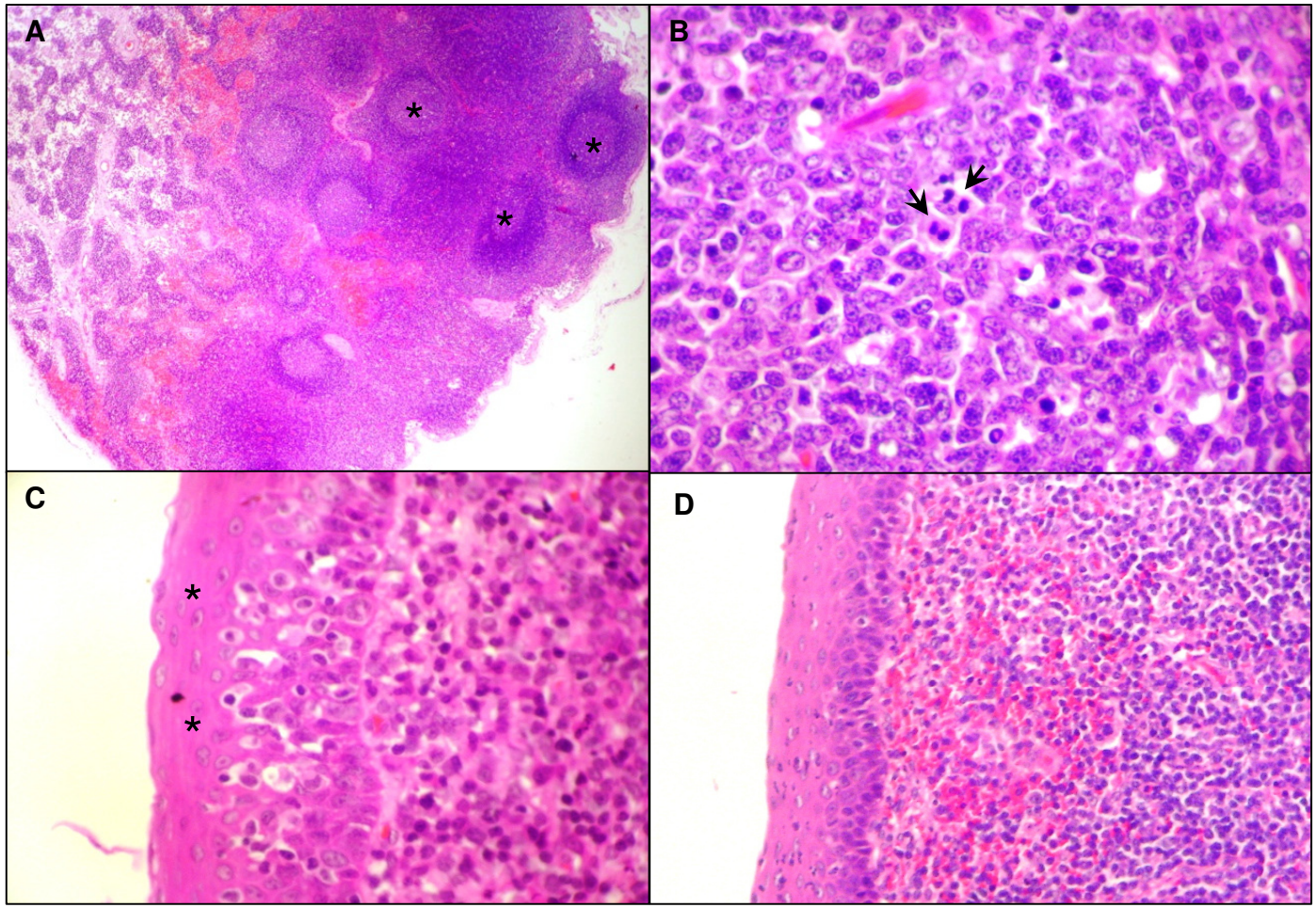

Figura 5: Achados histopatológicos nos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum.* (A) Linfonodo Mesentérico (200x); (B) Linfonodo Poplíteo, as setas indicam figuras mitóticas (400x); (C) Tonsilas com degeneração do epitélio (400x); (D) Tonsilas com petéquias (setas, 100x).

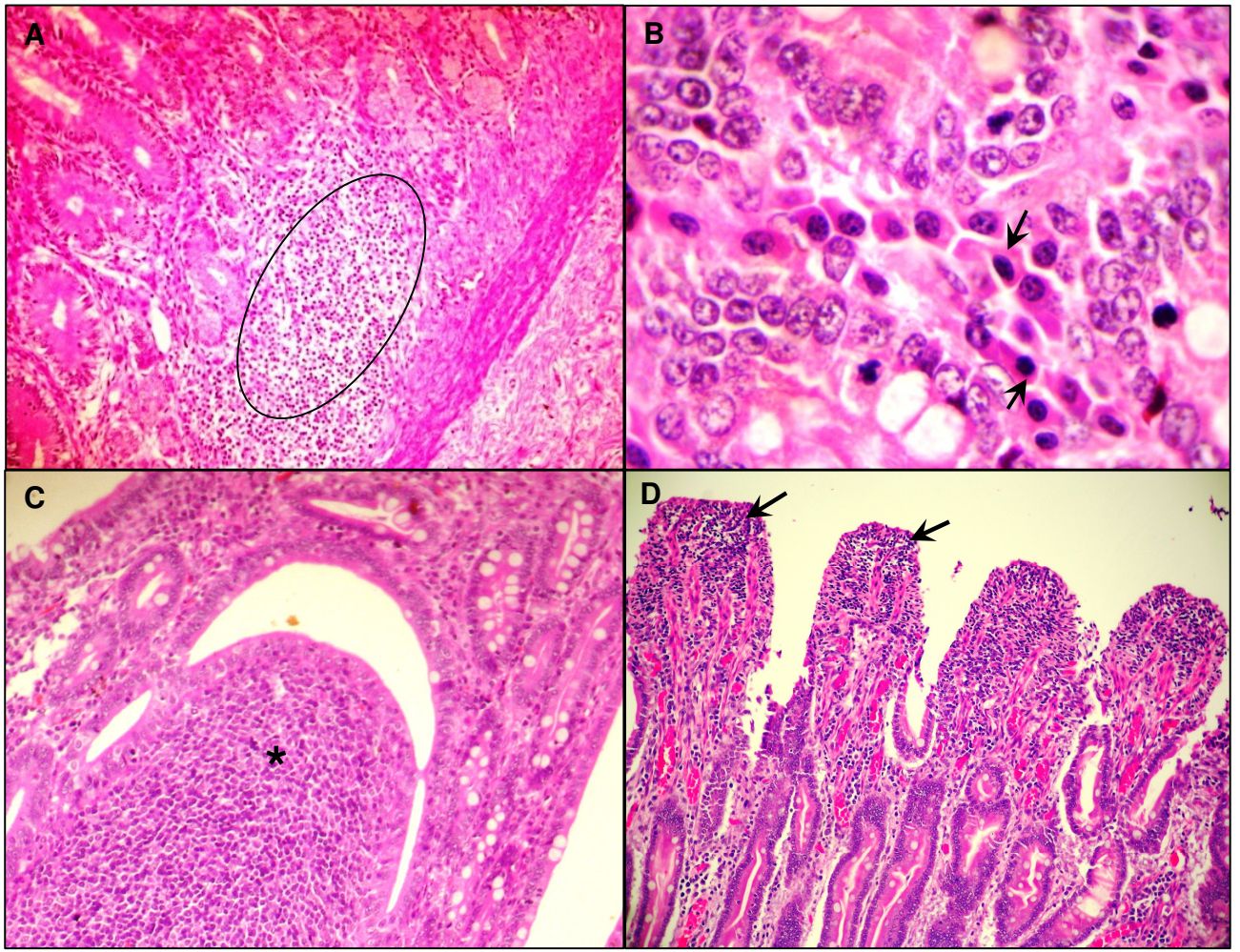

Figura 6: Achados histopatológicos nos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum.* (A) Mucosa gástrica com infiltrado inflamatório mononuclear (elipse, 200x); (B) Estômago com presença de células inflamatórias linfoplasmocitárias (setas, 400x); (C) Íleo, avanço da Placa de Peyer sobre a mucosa (200x); (D) Cólon com necrose nas vilosidades (100x).

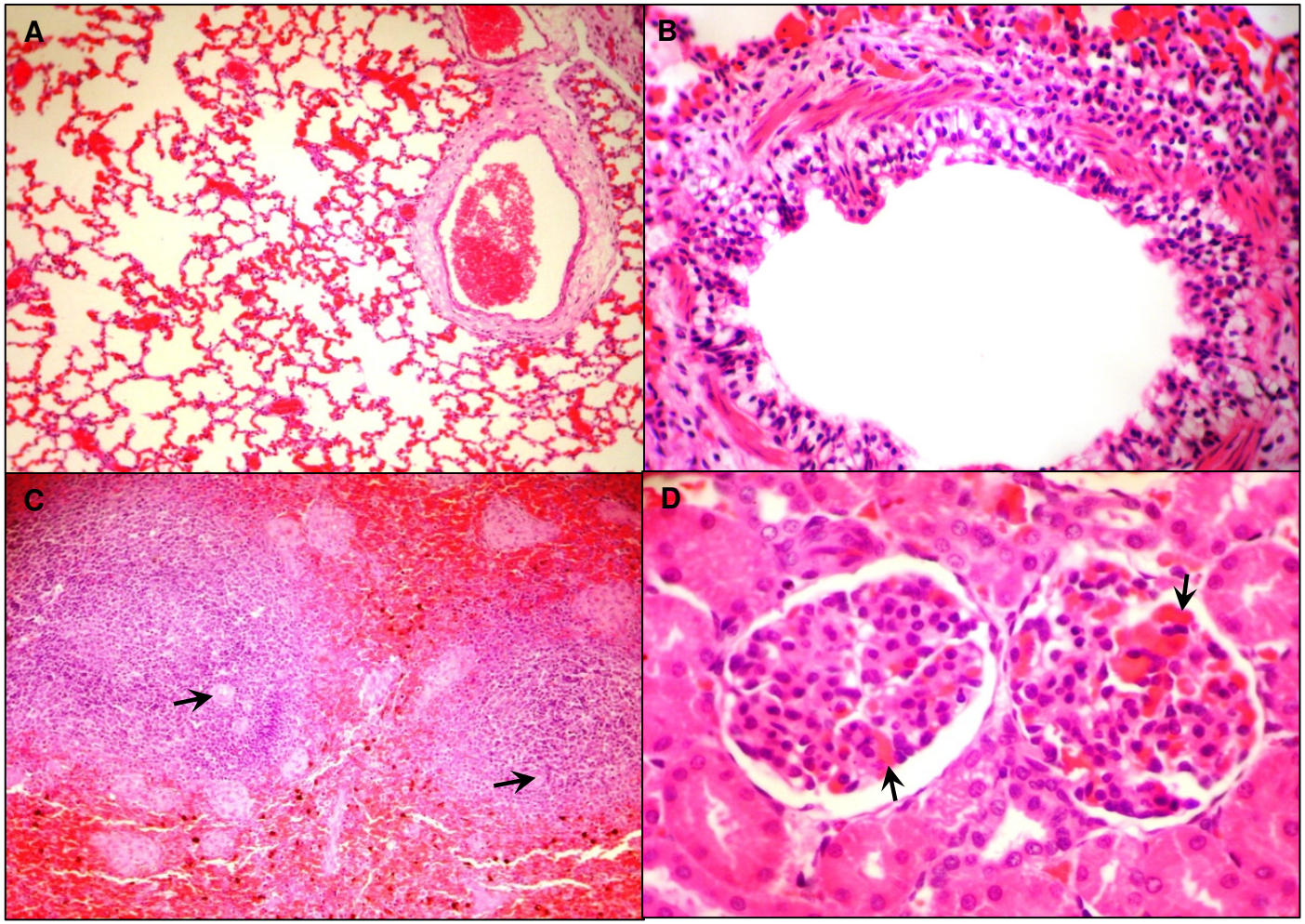

Figura 7: Achados histopatológicos nos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum.* (A) Pulmão congesto (100x) e com (B) infiltrado inflamatório peribronquiolar (200x); (C) Baço com hiperplasia de polpa branca com deslocamento periférico da arteríola (setas, 100x); (D) Rim congestão glomerular (setas, 400x).

5.4. Análise Imuno-histoquímica

Por meio do ensaio de IHQ, detectaram-se estruturas imunomarcadas nos cães experimentalmente infectados nos seguintes órgãos: linfonodos pré-escapular, mesentérico e poplíteo, tonsilas, esôfago, língua, rim, cérebro e cerebelo. Não foi observada formação de cistos em tecidos musculares e no SNC, assim como não foi detectada a presença do parasito nas amostras de tecidos do cão controle. Em todos os órgãos marcados, de todos os cães infectados, não houve um padrão de intensidade de marcação: maior tempo de infecção com maior quantidade de parasitos marcados. A relação dos órgãos marcados pela IHQ com os respectivos animais está descrita na Tabela 5 e ilustrada nas Figuras 8 e 9.

Tabela 5: Relação dos animais e respectivos órgãos positivos pela IHQ.

Órgãos	Cão 1 controle	Cão 2 (7dpi)	Cão 3 (14dpi)	Cão 4 (21dpi)	Cão 5 (28dpi)
Linfonodos Submandibular	–	–	–	–	–
Pré-escapular	–	–	X	–	–
Mesentérico	–	–	–	–	X
Poplíteo	–	–	X	–	–
Tonsilas	–	–	–	–	–
Esôfago	–	X	X	–	–
Estômago	–	–	–	–	–
Duodeno	–	–	–	–	–
Jejuno	–	–	–	–	–
Íleo	–	–	X	–	–
Ceco	–	–	X	–	–
Cólon	–	–	X	–	–
Ducto Biliar	–	–	–	–	–
Língua	–	–	–	X	X
Baço	–	–	–	–	–
Rim	–	X	–	–	–
Fígado	–	–	–	–	–
Pulmão	–	–	–	–	X
Pâncreas	–	–	–	–	X
Coração	–	–	–	X	–
Cérebro	–	–	–	X	X
Cerebelo	–	–	X	–	–

(–) Amostras negativas
(X) Amostras positivas

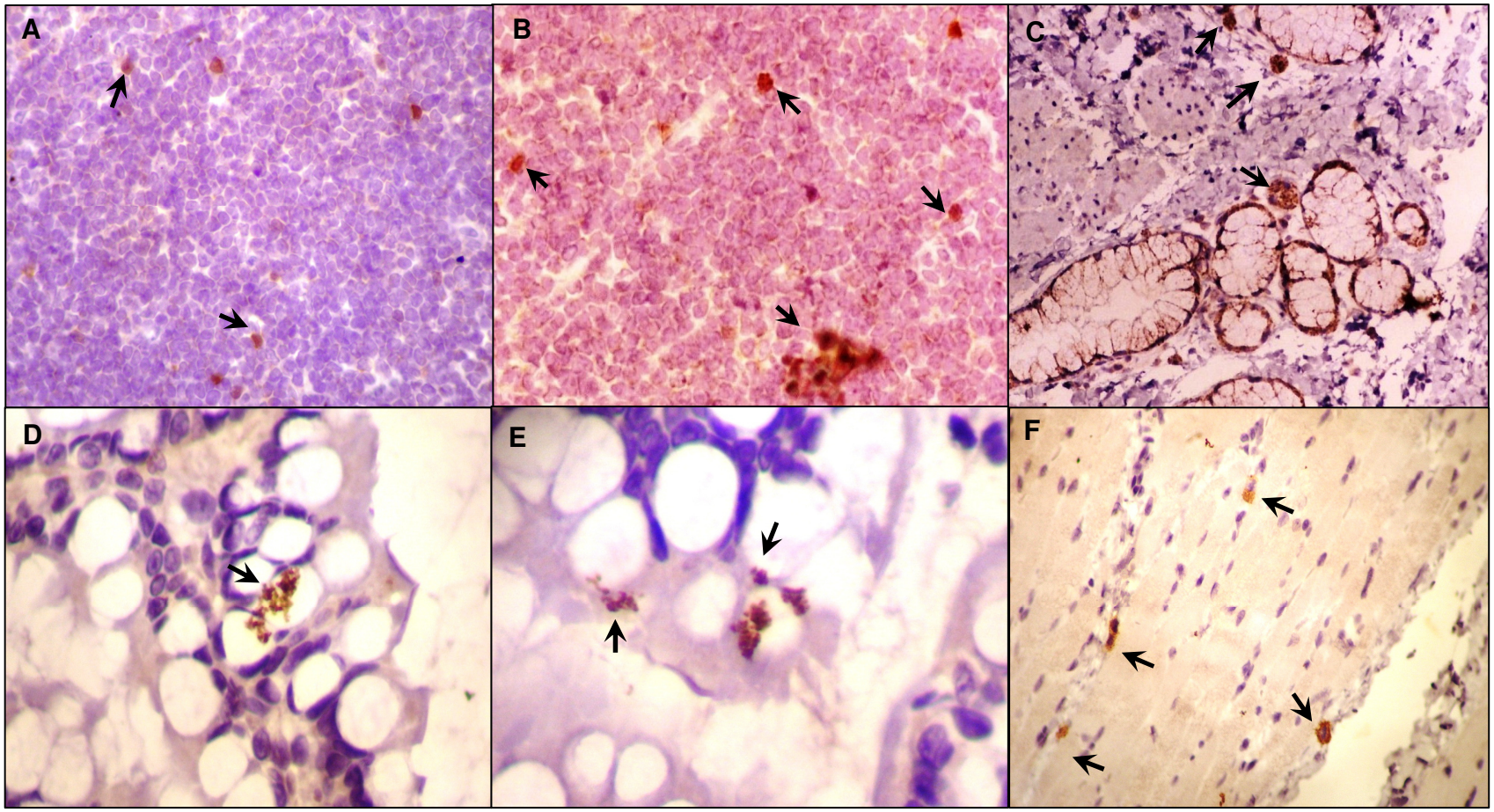

Figura 8: Fotomicrografia de órgãos dos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum*, marcados pela técnica de imuno-histoquímica. (A) Linfonodo pré-escapular (200x) e (B) Linfonodo poplíteo (200x), (C) Esôfago (100x) e (D) Íleo, (E) Cólon (1000x) e (F) Língua com imunomarcações para o parasito (200x). Complexo ABC.

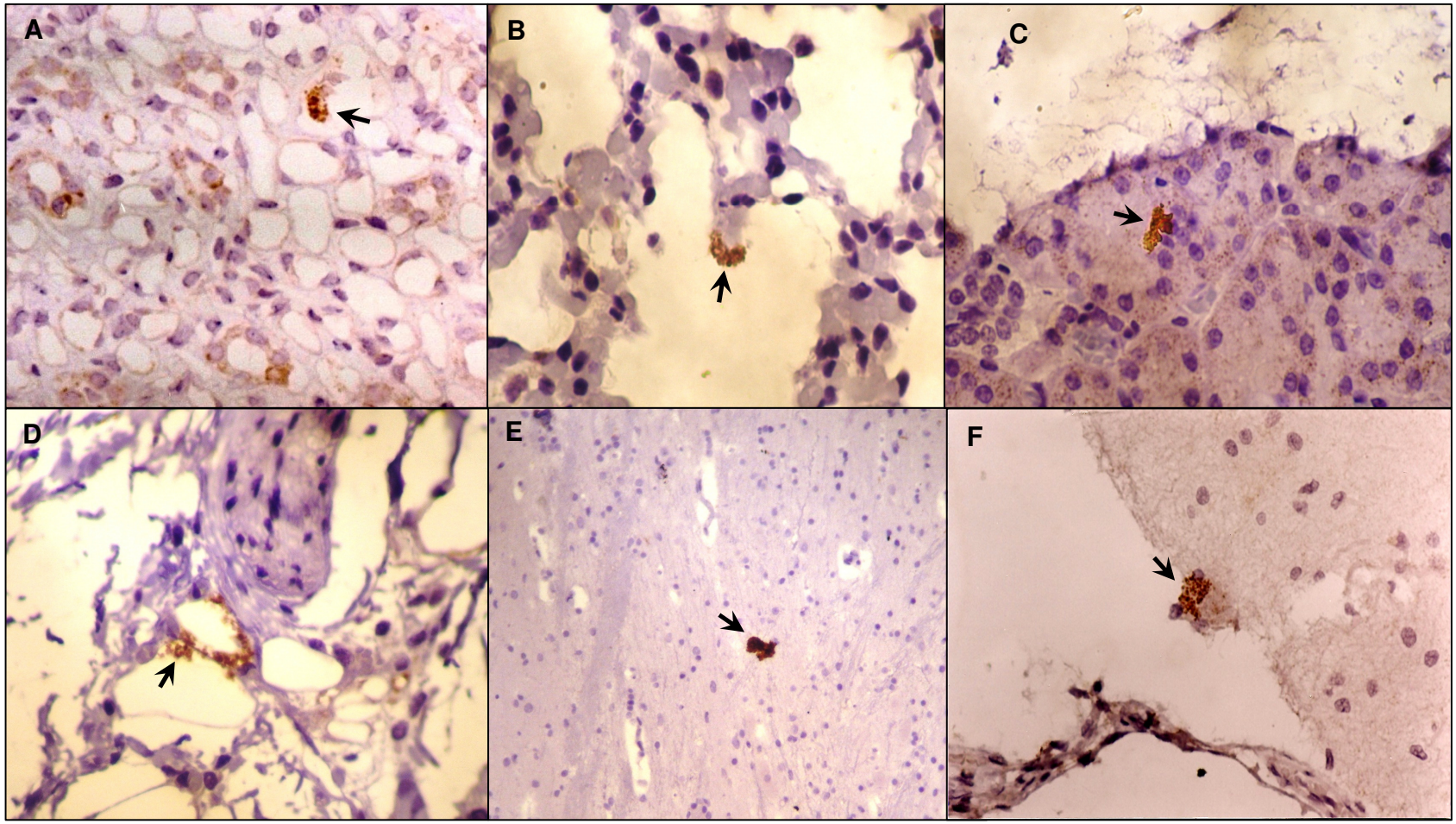

Figura 9: Fotomicrografia de órgãos dos cães experimentalmente infectados com *Neospora caninum* marcados pela técnica de imuno-histoquímica. (A) Rim (400x), (B) Pulmão (400x), (C) Pâncreas (400x), (D) Coração (200x), (E) Cérebro (100x) e (F) Cerebelo (400x) com imunomarcações positivas para o parasito. Complexo ABC.

5.5. Reação de imunofluorescência indireta em tecido

A presença de *N. caninum* foi detectada pela reação de imunofluorescência indireta nos seguintes tecidos dos cães experimentalmente infectados: esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon, ducto biliar, língua, rim, pulmão, pâncreas, coração, cérebro e cerebelo. Não foi detectada a presença do parasito nas amostras de órgãos do cão controle. A relação dos órgãos com os respectivos animais está listada na Tabela 6 e ilustrada nas Figuras 10, 11, 12 e 13.

Tabela 6: Relação dos cães e respectivos órgãos positivos pela RIFIT.

Órgãos	Cão 1 controle	Cão 2 (7dpi)	Cão 3 (14dpi)	Cão 4 (21dpi)	Cão 5 (28dpi)
Linfonodos Submandibular	–	–	–	–	–
Pré-escapular	–	–	–	–	–
Mesentérico	–	–	–	–	–
Poplíteo	–	–	–	–	–
Tonsilas	–	–	–	–	–
Esôfago	–	X	–	–	–
Estômago	–	X	–	–	–
Duodeno	–	X	X	–	–
Jejuno	–	X	X	–	–
Íleo	–	X	X	–	–
Ceco	–	–	X	–	–
Cólon	–	X	X	X	–
Ducto Biliar	–	–	X	X	–
Língua	–	–	–	X	X
Baço	–	–	–	–	–
Rim	–	–	–	X	–
Fígado	–	–	–	–	–
Pulmão	–	–	–	X	X
Pâncreas	–	–	–	X	X
Coração	–	–	–	X	–
Cérebro	–	–	–	X	X
Cerebelo	–	–	–	–	X

(–) Amostras negativas
(X) Amostras positivas

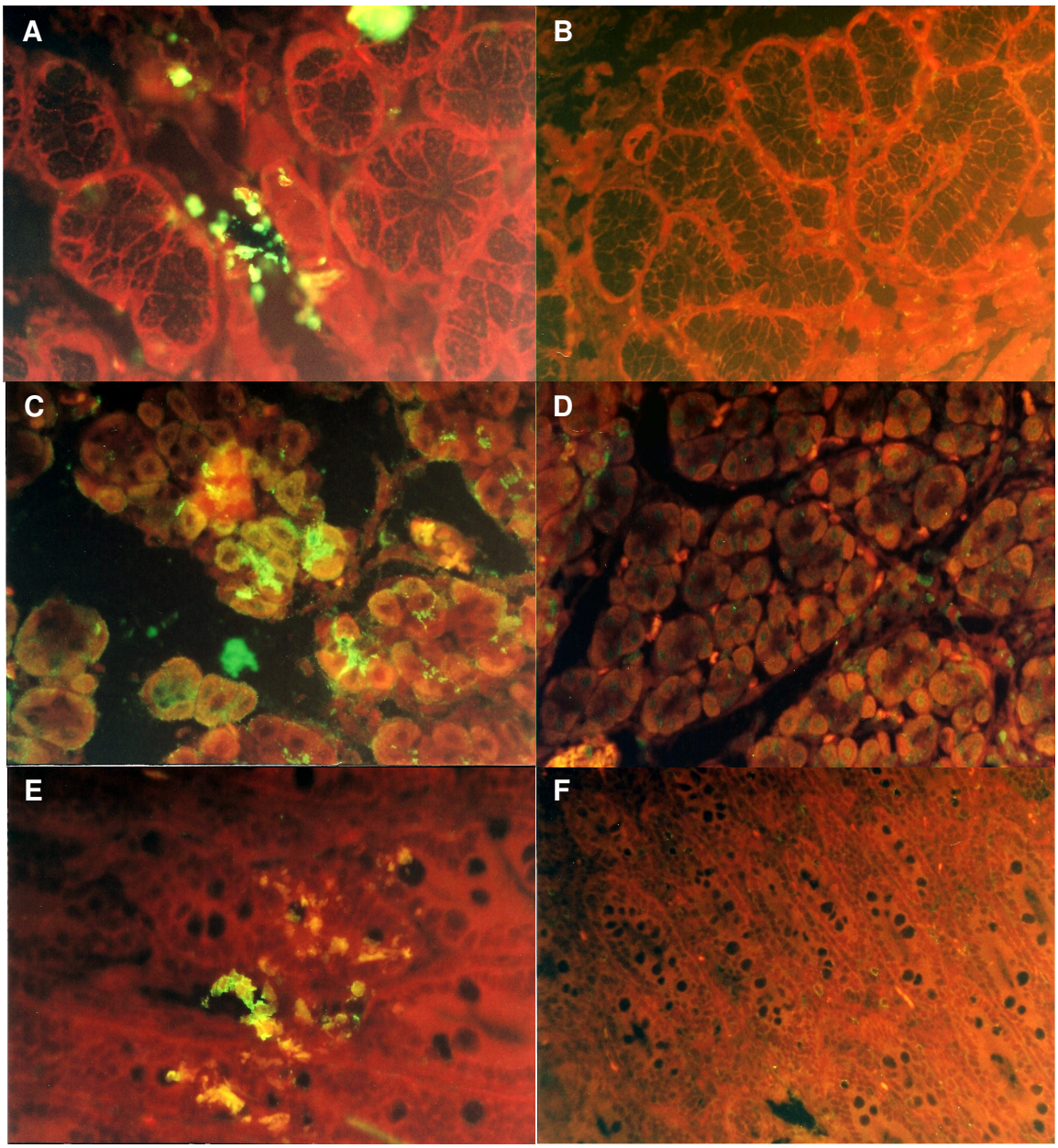

Figura 10: Verificação da presença de antígenos de *Neospora caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados. Marcações positivas para *N. caninum*: (A) Esôfago; (C) Estômago; (E) Duodeno. Controles negativos: (B) Esôfago; (D) Estômago; (F) Duodeno. RIFIT, 400x.

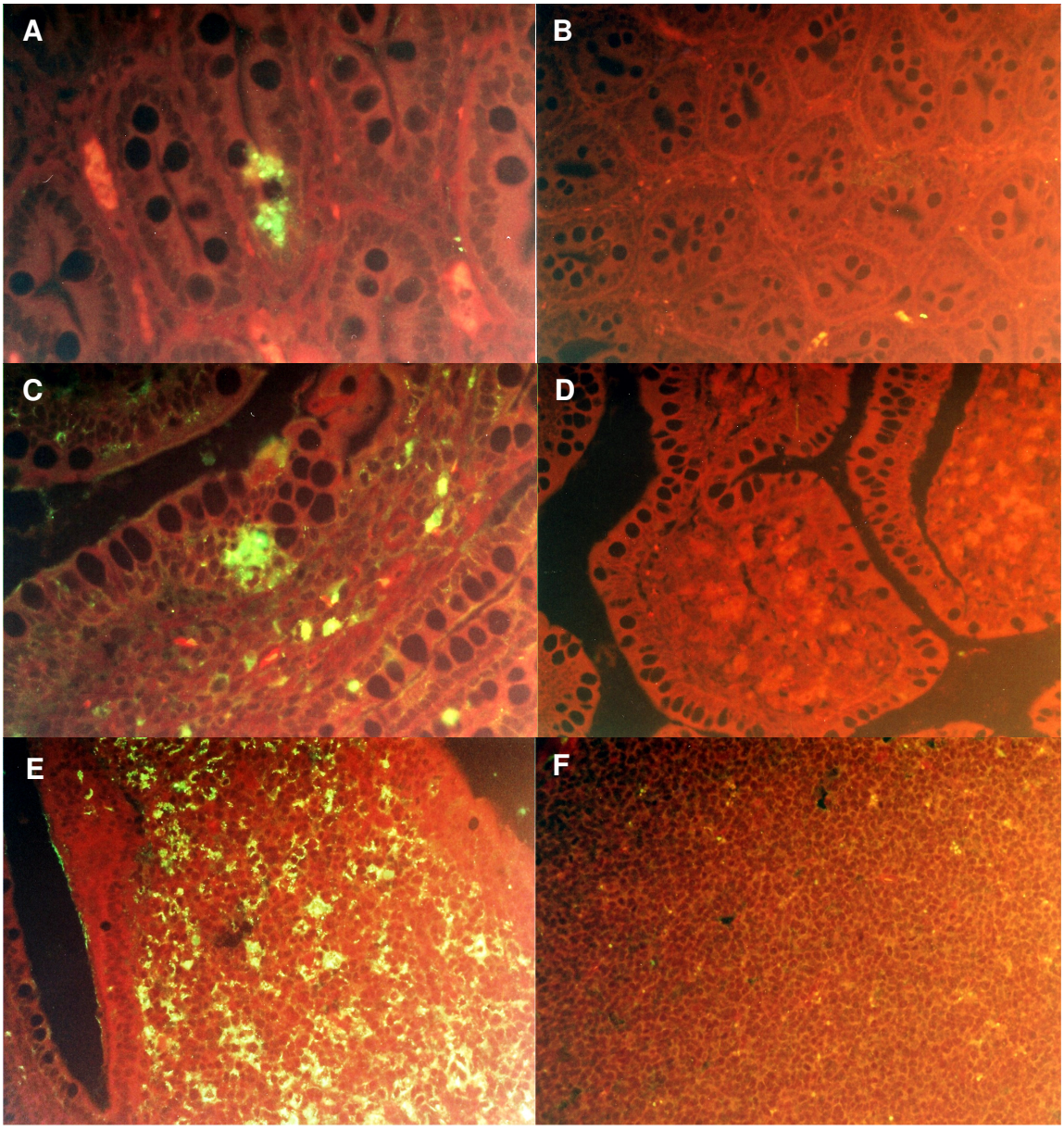

Figura 11: Verificação da presença de antígenos de *Neospora caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados. Marcações positivas para *N. caninum*: (A) Jejuno; (C) Íleo; (E) Placa de Peyer no íleo. Controles negativos: (B) Jejuno; (D) Íleo; (F) Placa de Peyer. RIFIT, 400x.

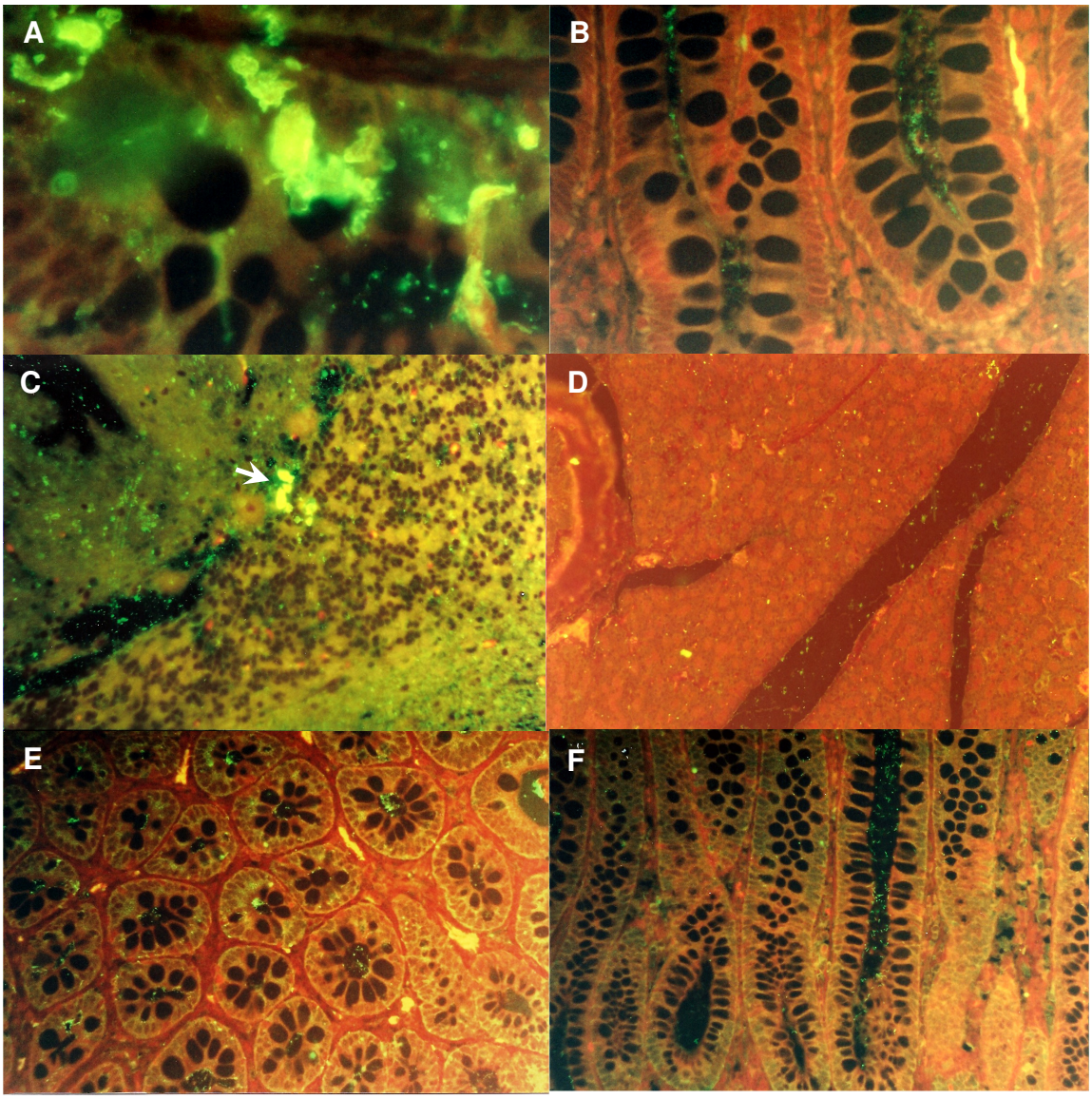

Figura 12: Verificação da presença de antígenos de *Neospora caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados. Marcação positiva para *N. caninum*: (A) Ceco (100x), (C) Pâncreas (seta, 200x). Controles negativos: (B) Ceco; (D) Pâncreas; (E) e (F) Cólon (200x). RIFIT.

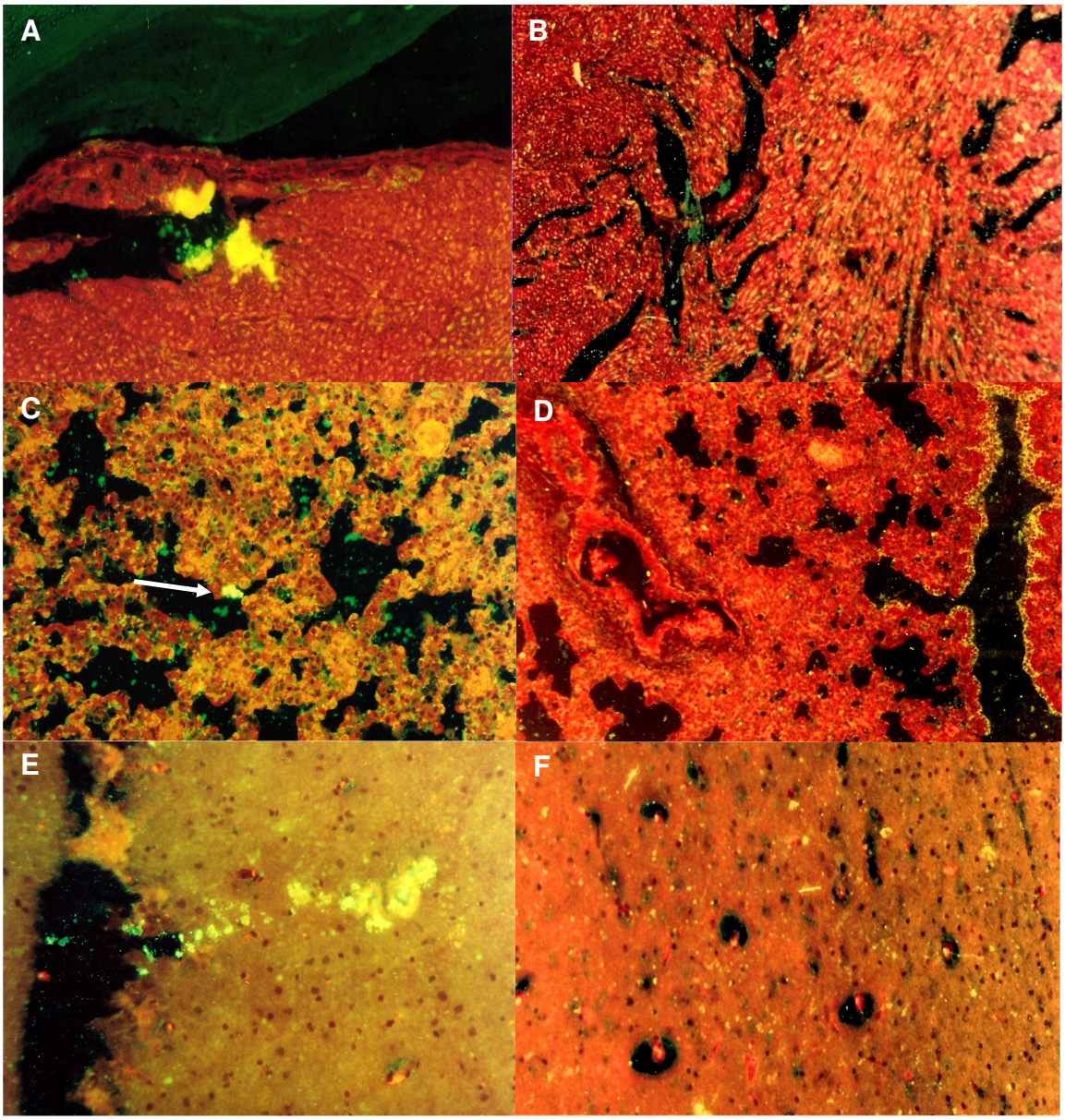

Figura 13: Verificação da presença de antígenos de *Neospora caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados. Marcação positiva para *N. caninum*: (A) Coração, (C) Pulmão (seta), (E) Cérebro. Controles negativos: (B) Coração; (D) Pulmão, (F) Cérebro. RIFIT, 200x.

5.6. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR

5.6.1. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em fragmentos de tecidos de cães experimentalmente infectados

Não foi possível detectar o DNA do parasito nos fragmentos dos órgãos colhidos dos cães experimentalmente infectados pela PCR (Figura 14). Utilizou-se como controle positivo da reação, DNA extraído de taquizoítas de *N. caninum* do cultivo celular (canaleta 2) e, como controle negativo, água ultrapura amplificada (canaleta 3).

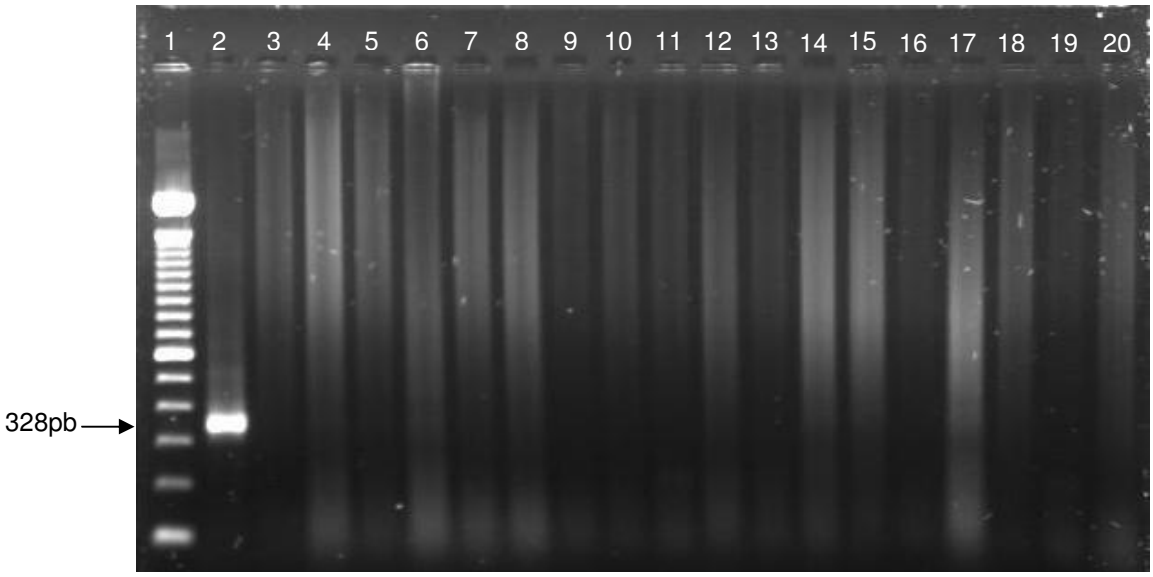

Figura 14: Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em amostras de tecidos de cães experimentalmente infectados. Canaleta 1: Marcador de peso molecular (100pb); canaleta 2: Controle positivo; canaleta 3: Controle negativo; canaletas 4 a 20: produtos amplificados de amostras de tecido.

5.6.2. Detecção de DNA de *N. caninum* pelo "Real-time PCR" em fragmentos de tecidos de cães experimentalmente infectados

A amplificação das amostras de DNA dos tecidos dos cães experimentalmente infectados resultou na presença de DNA de *N. caninum* em fragmentos de órgãos dos cães 3, 4 e 5. Não foi detectado o DNA do parasito nas amostras de órgãos do cão 1 e cão 2.

Tabela 7: Detecção de DNA de *Neospora caninum* pelo "Real-time PCR" em amostras de tecidos de cães experimentalmente infectados.

Órgãos	Cão 1 controle	Cão 2 (7dpi)	Cão 3 (14dpi)	Cão 4 (21dpi)	Cão 5 (28dpi)
Linfonodos Submandibular	–	–	X	X	X
Pré-escapular	–	–	X	X	–
Mesentérico	–	–	X	X	X
Poplíteo	–	–	X	X	X
Esôfago	–	–	X	X	X
Estômago	–	–	X	X	X
Duodeno	–	–	X	X	X
Jejuno	–	–	X	X	X
Íleo	–	–	X	X	X
Ceco	–	–	X	X	X
Cólon	–	–	X	X	–
Língua	–	–	X	X	–
Baço	–	–	X	X	–
Rim	–	–	X	–	X
Fígado	–	–	X	X	–
Pulmão	–	–	X	X	X
Pâncreas	–	–	X	X	X
Coração	–	–	X	X	–
Cérebro	–	–	X	X	X

(–) Amostras negativas
(X) Amostras positivas

5.6.3. Estudo comparativo de diagnósticos da neosporose pelas técnicas de IHQ, RIFIT e "Real-Time PCR"

A comparação dos resultados obtidos na investigação da presença de *N. caninum* nos tecidos dos cães experimentalmente infectados pelas técnicas de IHQ, RIFIT e "Real-time PCR", podem ser avaliadas pela tabela a seguir.

Tabela 8: Tabela comparativa dos resultados obtidos pelas técnicas de IHQ, RIFIT e “Real-Time PCR”, na detecção de *Neospora caninum* nos tecidos dos cães experimentalmente infectados.

	IHQ					RIFIT						“Real Time PCR”			
	Cão 1 controle	Cão 2 (7dpi)	Cão 3 (14dpi)	Cão 4 (21dpi)	Cão 5 (30dpi)	Cão 1 controle	Cão 2 (7dpi)	Cão 3 (14dpi)	Cão 4 (21dpi)	Cão 5 (30dpi)	Cão 1 controle	Cão 2 (7dpi)	Cão 3 (14dpi)	Cão 4 (21dpi)	Cão 5 (30dpi)
Linfonodos Submandibular	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X	X
Pré-escapular	–	–	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X	–
Mesentérico	–	–	–	–	X	–	–	–	–	–	–	–	X	X	X
Poplíteo	–	–	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X	X
Tonsilas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	*	*	*	*
Esôfago	–	X	X	–	–	–	X	–	–	–	–	–	X	X	X
Estômago	–	–	–	–	–	–	X	–	–	–	–	–	X	X	X
Duodeno	–	–	–	–	–	–	X	X	–	–	–	–	X	X	X
Jejuno	–	–	–	–	–	–	X	X	–	–	–	–	X	X	X
Íleo	–	–	X	–	–	–	X	X	–	–	–	–	X	X	X
Ceco	–	–	X	–	–	–	–	X	–	–	–	–	X	X	X
Cólon	–	–	X	–	–	–	X	X	X	–	–	–	X	X	–
Ducto Biliar	–	–	–	–	–	–	–	X	X	–	–	*	*	*	*
Língua	–	–	–	X	X	–	–	–	X	X	–	–	X	X	–
Baço	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X	–
Rim	–	X	–	–	–	–	–	–	X	–	–	–	X	–	X
Fígado	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X	–
Pulmão	–	–	–	–	X	–	–	–	X	X	–	–	X	X	X
Pâncreas	–	–	–	–	X	–	–	–	X	X	–	–	X	X	X
Coração	–	–	–	X	–	–	–	–	X	–	–	–	X	X	–
Cérebro	–	–	–	X	X	–	–	–	X	X	–	–	X	X	X
Cerebelo	–	–	X	–	–	–	–	–	–	X	–	*	*	*	*

*Material não colhido para PCR
(–) Amostras negativas
(X) Amostras positivas

5.6.4. Detecção de DNA de oocisto de *Neospora caninum* pela PCR em fezes de cães experimentalmente infectados

A reação em cadeia pela polimerase, realizada a partir de amostras de fezes de cães experimentalmente infectados, empregando o kit de extração de DNA de tecido (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagem®, EUA), foi capaz de produzir sinais de amplificação detectáveis, conforme ilustrado na Figura 15.

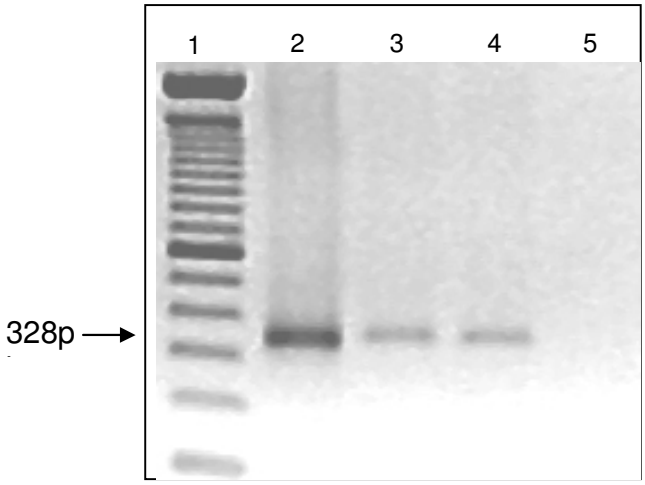

Figura 15: Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em amostras de fezes de cães experimentalmente infectados. Linha 1: Marcador de peso molecular (100pb); linha 2: Controle positivo; linha 3 e 4: Produto amplificado de amostra de fezes; linha 5: Controle negativo.

6. Detecção de RNA mensageiro (m-RNA) dos genes Nc*SAG*-1 e Nc*SAG*-4 na membrana CA dos embriões inoculados

A expressão do m-RNA dos genes Nc*SAG*-1 e Nc*SAG*-4 pela PCR foi positiva, apresentando a expressão simultânea dos genes, significando a conversão de fase taquizoíta-bradizoíta. A maior intensidade das bandas formadas, foi proporcionada pelo Nc*SAG*-1, entretanto o aumento gradual da expressão do Nc*SAG*-4 e a diminuição de expressão do Nc*SAG*-1, foi observado em embriões que tiveram o período de incubação prolongado.

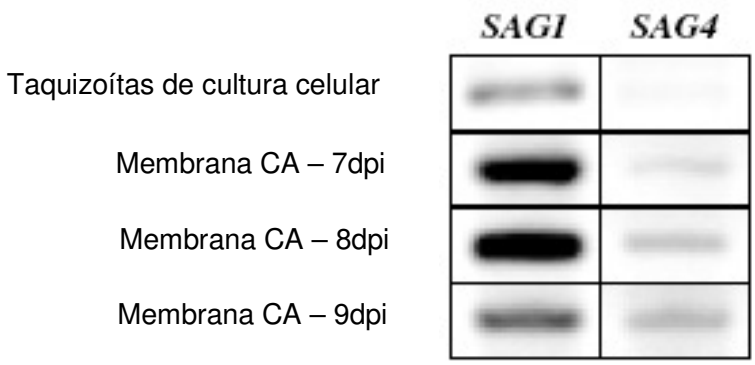

Figura 16: Expressão dos genes Nc*SAG*-1 e Nc*SAG*-4 de *Neospora caninum* pela PCR, em membranas cório-alantóides de embriões inoculados em diferentes períodos de incubação.

7. DISCUSSÃO

Nas duas últimas décadas, a neosporose tem sido estudada por cientistas de muitos países. Várias espécies de animais domésticos e selvagens têm sido alvos de levantamentos sorológicos (MINEO et al., 2001; SOUZA et al., 2001; GUIMARÃES JUNIOR et al., 2004; VITALIANO et al., 2004; VÁCLAVEK et al., 2006; ALMERÍA et al, 2007). O modelo experimental de infecção mais comumente usado é com os roedores, pela facilidade de manipulação e relativo baixo custo. Pesquisas conduzidas em cães naturalmente infectados visam o isolamento e caracterização de *N. caninum*, observação de sinais clínicos, diagnóstico da doença e tratamento (DUBEY et al., 2007; PALAVICINI et al., 2007; REICHEL et al., 2007). Entretanto, poucos são os estudos realizados com infecção experimental em cães para averiguar o ciclo biológico do parasito, nas fases sexuada e assexuada e patogenia da doença.

A utilização de ovos embrionados como modelo para isolamento de protozoário (BUTTITA, 1951), desenvolvimento (WARREN e RUSS, 1948; ROIRON e GALISTIN, 1963; WUNDERLIN et al., 1997) e estudo da biologia do parasito (MELLO e DEANE, 1976; QUE et al., 2004), tem sido empregadas há vários anos. A produção de taquizoítas de *T. gondii* em embriões de galinha tornou-se viável há algumas décadas, devido ao baixo custo operacional e a obtenção de um meio de cultivo naturalmente estéril. Este modelo evita a eutanásia de animais (WUNDERLIN et al., 1997) e permite o estudo das diferentes fases do parasito, como já foi observado para *Trypanosoma cruzi,* que ocorrem em vertebrados e invertebrados, na gema e na membrana CA dos ovos (MELLO e DEANE, 1976). A infecção experimental de cães*,* por embriões de galinha infectados com *N. caninum* visando a obtenção de oocistos, vem proporcionando um novo modelo de infecção experimental em cães por FURUTA et al. (2007) e MINEO (2007). Além disso, a inoculação de taquizoítas de *N. caninum* em ovos embrionados*,* proporcionou a constatação da presença simultânea de mRNA de taquizoíta e bradizoíta, pelos marcadores específicos para os genes Nc*SAG*-1 e Nc*SAG*-4. Observa-se o mesmo perfil de expressão dos genes em taquizoítas oriundos de cultura celular, levando a concluir que a infecção em ovos

embrionados produz uma qualidade similar de parasitos semelhantes aos advindos de protocolos *in vitro.* Notou-se ainda, que quanto maior o tempo de incubação dos ovos infectados, maior foi a expressão do gene Nc*SAG*-4 (específico para bradizoítas), significando que o tempo de formação de cistos teciduais depende do tempo de infecção do hospedeiro. A expressão desses genes também foi comunicada anteriormente, afirmando que essa conversão de fases é um evento progressivo (RISCO-CASTILLO et al., 2004; FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2006).

Todos os cães do primeiro, segundo e terceiro grupo experimental tornaram-se infectados após a administração de membranas CA e ovos inteiros, sejam pela presença de oocistos nas fezes ou pela soroconversão, mesmo que tardiamente, ou seja, após 40dai, comparando-se com os animais do quarto experimento. Entretanto nos cães do quarto grupo, os anticorpos anti-*N. caninum* foram identificados a partir dos 14dai. A prematura soroconversão desses cães foi em decorrência da administração prévia à infecção, de solução de bicarbonato de sódio aos mesmos, neutralizando o pH estomacal e viabilizando a infecção de cada animal com um maior número de parasitos vivos. Ressalta-se ainda a possibilidade da disseminação do protozoário a partir do esôfago e estômago, acelerando a infecção e, conseqüentemente, a soroconversão, baseando-se nas marcações encontradas na IHQ. O mesmo procedimento de neutralização da acidez estomacal foi utilizado em infecção intra-gástrica de camundongos experimentalmente infectados com taquizoítas de *N. caninum,* estabelecendo a infecção nos roedores (TEIXEIRA et al., 2007).

Na primeira semana de experimento, aos 7dai, foi realizada a primeira eutanásia, do animal controle, não sendo encontrada nenhuma alteração nos órgãos do cão examinado. Porém, no animal infectado, 7dai, observou-se aumento dos linfonodos mesentéricos, sufusões na porção do duodeno e jejuno, evidenciação das Placas de Peyer na porção do jejuno e hiperplasia de polpa branca no baço. Não foi notada nenhuma alteração nos músculos esqueléticos desse cão, conforme já observado por PETERS et al. (2000) apenas uma leve descoloração dos músculos atrófico e gastrocnêmio, principalmente no membro

pélvico esquerdo, de um cão de 11 semanas que apresentava paresia do membro posterior esquerdo com extensão rígida. Após 14dai, as alterações observadas durante a necropsia foram menos evidentes, porém notou-se aumento dos linfonodos mesentéricos e das tonsilas, e pontos hemorrágicos no duodeno e jejuno. A partir dos 21dai e 28dai, observou-se no pulmão lesões típicas de pneumonia, conforme já observado por TEIXEIRA et al. (2007) em camundongos infectados. Poucos são os relatos necroscópicos de animais naturalmente e experimentalmente infectados, porém um estudo realizado com ratos inoculados com isolado de *N. caninum* de bovino infectado observou-se um severo aumento de linfonodos durante a necropsia (SAWADA et al., 1997). Outro estudo concretizado com diferentes espécies de roedores (*Mastomys natalensis, Meriones tristrami* e *Gerbillus dasyurus*), revelou durante a necropsia dos animais hepato e esplenomegalia, exsudado na cavidade abdominal, descoloração do parênquima do pulmão e dilatação do intestino delgado (HUKOVÁ-HOFMANNOVÁ et al., 2006).

Ao exame histopatológico, notou-se nos cães infectados pelo *N. caninum,* que a atividade celular dos linfonodos submandibular, pré-escapular, mesentérico e poplíteo, variou de moderado a intenso, devido intensa atividade mitótica das células linfóides localizadas na zona do manto. Pode-se atribuir tal fato a resposta imune dos animais frente à infecção aguda pelo *N. caninum.* Achados inflamatórios multifocais foram encontrados na maior parte dos órgãos analisados, após 7, 14, 21 e 28dai, entretanto não foi possível a visualização de taquizoítas nos focos inflamatórios pelo exame histopatológico. Poucos ou raros são os trabalhos que descrevem lesões macroscópicas e microscópicas nos órgãos de animais experimentalmente infectados. O linfonodo mais notadamente alterado macroscopicamente, devido ao aumento de tamanho foi o mesentérico, observados nos cães após 7, 14 e 21dai. Tal fato pode ser inferido, se comparado a *T. gondii*, sendo esse linfonodo o primeiro local de disseminação para outros órgãos através da circulação linfática e sanguínea (HILL et al., 2005).

No trato gastrointestinal, observou-se no estômago lesões caracteristicamente identificado como infiltrados inflamatórios entre as glândulas

de Brunner e/ou criptas de Lieberkühn e ainda edema de submucosa. No duodeno observou-se um infiltrado inflamatório misto na mucosa, e hiperplasia de células caliciformes. No jejuno, íleo e ceco observaram-se uma intensa reatividade das Placas de Peyer, ocultando a camada muscular da mucosa (Figura 6C). Na porção final do intestino ocorre um decréscimo da inflamação e necrose no ápice das vilosidades (Figura 6D). Mesmo ocorrendo inflamação nas porções citadas, não foi observada a presença do parasito em nenhuma delas. Em camundongos infectados pelo *N. caninum* foram encontrados taquizoítas dentro de células parietais da mucosa gástrica, apresentando moderada inflamação (SHIBAHARA et al., 1999). Comparativamente a *T. gondii*, as formas encontradas em células intestinais dos gatos, principalmente no intestino delgado, são os gamontes, que se localizam acima do núcleo das células epiteliais das vilosidades (DUBEY et al., 1998).

Constatou-se no subepicárdio um infiltrado de células mononucleares multifocal com eventuais eosinófilos. Variações inflamatórias também podem ser encontradas no subendocárdio e miocárdio com infiltrações de linfócitos, histiócitos, plasmócitos e granulócitos em cães infectados naturalmente com *N. caninum* (PETERS et al., 2000). Em todos os animais do quarto grupo experimental observou-se intensa degeneração vacuolar na região próxima a veia centrolobular do fígado, além de necrose de alguns hepatócitos, congestão nos sinusóides e infiltrado inflamatório mononuclear focal discreto. Normalmente, a presença de necrose hepatocelular associada à infiltração mononuclear acompanha a presença, mesmo que discreta, de taquizoítas, conforme relato de PETERS et al., 2000, o que não observado neste trabalho. Nos pulmões, constatou-se evidente edema e congestão, sendo encontrado conteúdo espumoso na saída do pulmão em estágios mais avançados da infecção (14 e 21dai, Figura 4D); e espessamento de septo, infiltrado inflamatório peri-bronquiolar e septo-alveolar sugerindo pneumonia no início da infecção (7 e 14dai, Figura 7B). Roedores também são altamente susceptíveis à infecção com *N. caninum,* desenvolvendo uma severa broncopneumonia purulenta (HUKOVÁ-HOFMANNOVÁ et al., 2006). A presença de infiltrado inflamatório, principalmente

nos pulmões corrobora com dados já publicados em fetos abortados de bovinos (PESCADOR et al., 2007).

No baço dos cães, observou-se hiperplasia de polpa branca com deslocamento periférico da arteríola principal, degeneração no centro dos folículos linfóides e congestão, variando de moderada a intensa (Figura 7C). Há relatos de esplenomegalia em roedores experimentalmente infectados, além da presença de *N. caninum* neste órgão detectado pela PCR (HUKOVÁ-HOFMANNOVÁ et al., 2006). No rim observou-se congestão glomerular e infiltrado mononuclear disperso na região medular (Figura 7D), sem contudo, ter sido encontrado parasito nessa região. Foi notada a presença de infiltrado inflamatório focal composto por células polimorfonucleares na língua após 21dai. No pâncreas, cérebro e cerebelo não foram encontrados nenhuma alteração. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, notou-se maior intensidade de achados macroscópicos e histopatológicos descritos nos órgãos dos cães, principalmente em linfonodos mesentéricos e no trato gastrintestinal, propondo-se um caminho de disseminação de *N. caninum* nos cães infectados. A maior quantidade de parasitos viáveis podem ter iniciado a dispersão pelo esôfago e estômago, continuando pelas porções seguintes do intestino, assim como pelos linfonodos mesentéricos, que se encontravam visivelmente aumentados e em notada atividade linfóide. Também HILL et al., 2005, concordam que a partir dos linfonodos, os parasitos podem atingir a circulação linfática e sanguínea, alcançando outros órgãos, assim como para o *T. gondii*.

A análise da presença de *N. caninum* nas amostras de tecidos dos cães experimentalmente infectados foi realizada primeiramente por meio da IHQ, segundo MINEO (2007) e FURUTA et al. (2007). É uma técnica muito utilizada para auxiliar no diagnóstico da neosporose em tecidos de várias espécies animais (LINDSAY et al., 1989; PETERS et al., 2000; PETERS et al., 2001; MINEO, 2007; PESCADOR et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2007). Empregando-se o método avidina-biotina-peroxidase, foi possível observar a presença de taquizoítas de *Neospora* em alguns órgãos dos cães experimentalmente infectados. Não houve

um padrão de positividade em relação ao tempo de infecção de cada animal, mas todos os cães infectados apresentaram reação positiva à presença do parasito. Observaram-se marcações positivas nos linfonodos pré-escapular, mesentérico e poplíteo, 14dai, 28dai e 14dai respectivamente, os quais estavam visivelmente aumentados durante a necropsia e apresentaram alterações no exame histopatológico. As tonsilas também apresentaram alterações histopatológicas, porém pela IHQ o resultado obtido foi negativo. A partir do trato digestório foi observada marcação no esôfago (7 e 14dai), mesmo não sendo observadas lesões pelo exame histopatológico; e também no íleo, ceco e cólon (14dpi). A presença de *N. caninum* nos órgãos dos cães experimentalmente infectados, observados pela IHQ, confirma a infecção pelo parasito utilizando ovos embrionados como fonte de antígeno e infecção (FURUTA et al., 2007).

Após a análise dos órgãos pela IHQ, estes foram submetidos à RIFIT, técnica padronizada por MACHADO (2006, não publicado). Por esta técnica pode-se observar um padrão de infecção bem evidente em relação ao tempo de infecção dos grupos experimentais. Logo na primeira semana de experimento, nota-se positividade apenas no trato digestório do cão, via em que foi realizada a infecção. Na semana seguinte (14dai), o parasito foi encontrado também no ducto biliar, e nas semanas subseqüentes (21 e 28dai), observou-se a disseminação do parasito para todos os outros órgãos. Existiram concordâncias parciais com os resultados obtidos com essa técnica comparada à IHQ, talvez pelo fato dos cortes parafinados utilizados nas duas reações não tenham sido cortes seriados. Isso pode ter influenciado nos resultados obtidos tanto na histopatologia como na IHQ e RIFIT.

A detecção molecular do DNA do *N. caninum* pela PCR, não revelou a presença do parasito nos fragmentos de órgãos dos cães experimentalmente infectados. Mesmo sendo uma técnica extremamente sensível, talvez a quantidade de DNA do parasito presente nos tecidos não tenha sido o suficiente para revelar positividade, já que pelos resultados obtidos das outras técnicas realizadas a presença do parasito foi muito pequena. Pode-se concluir também,

que nos pequenos fragmentos de tecidos utilizados para a extração de DNA (25 mg), o parasito estivesse ou não presente. Esta técnica é largamente usada no diagnóstico de neosporose, em animais natural e experimentalmente infectados (HUKOVÁ-HOFMANNOVÁ et al., 2006; PENA et al., 2007), utilizando principalmente o cérebro para detectar cistos formados pelo parasita.

A certificação da presença de *N. caninum* por métodos moleculares foi obtida pelo uso do "Real-time PCR", método mais sensível e específico que o PCR comum e relativamente novo na parasitologia (BELL e RANFOR-CARTWRIGHT, 2002). Utilizou-se o sistema SYBR Green, que detecta o aumento da emissão de fluorescência proporcional à quantidade de DNA amplificado, mesmo que a técnica seja afetada por amplificações não-específicas, especialmente quando a quantidade de DNA alvo seja baixa (GHALMI et al., 2008). O DNA de *N. caninum* foi detectado nos cães a partir dos 14, 21 e 28dai, na maioria dos órgãos pesquisados, e não foi detectado no cão controle e aos 7dai. Comparativamente, os dois animais soronegativos também foram negativos para o "Real-time PCR", e os que apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* foram PCR positivos.

Assim sendo, a não detecção de DNA do parasito pela PCR nos tecidos foi devido a pequena quantidade do mesmo parasitando tecidos dos cães infectados, o que pode ser correlacionado aos resultados de marcação do parasito pela IHQ e RIFIT. Além disso, pela técnica de "Real time-PCR" não foi possível quantificar o parasito, reforçando, mais uma vez, o pequeno número de *N. caninum* parasitando tecidos.

Apesar de não se observar concordância entre os resultados dos testes aplicados, a utilização de todos eles pode contribuir, com segurança, no diagnóstico da neosporose.

8. CONCLUSÕES

- Conclui-se que o modelo experimental com ovos embrionados infectados com *N. caninum*, pode ser uma fonte de produção de antígenos e modelo de infecção experimental em animais;

- A infecção oral em cães com ovos embrionados infectados com *N. caninum*, resultou na eliminação de oocistos nas fezes, confirmando a instalação do parasito no hospedeiro, como citado recentemente;

- A prévia administração de solução de bicarbonato de sódio, via oral, aos cães, possibilitou uma prematura soroconversão dos cães do quarto grupo experimental iniciando a disseminação do parasito pelo esôfago, estômago e linfonodos mesentéricos;

- A infecção oral dos cães utilizados não possibilitou a manifestação de sinais clínicos característicos da neosporose;

- As técnicas de diagnóstico utilizadas, a imunoistoquímica, a reação imunofluorescência indireta em tecidos e o “Real-time PCR”, permitiram a detecção do parasito nos tecidos dos cães infectados;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S.; VIDAL, D.; FERRE, D.; PABÓN, M.; FERNÁNDEZ-DE-MERA, M. I. G.; RUIZ-FONS, F.; ALZAGA, V.; MARCO, I.; CALVETE, C.; LAVIN, S.; GORTAZAR, C.; LÓPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 21-28, 2007.

BAKER, D. G.; MORISHITA, T. Y.; BROOKS, D. L.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J. P. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum.* **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p.783-785, 1995.

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, n. 2, p. 207-215, 1994.

BELL, A. S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Real-time quantitative PCR in Parasitology. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 337-342, 2002.

BENBROOK, E.A.; SLOSS, M. W. **Parasitología Clínica Veterinaria.** Primera edición em espanõl. Cía. Editorial Continental, S. A., 1965. 256 p.

BJERKÅS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**. v. 70, n. 2, p.271-4, 1984.

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, n. 9, p. 1441-1444, 1996.

BLAŠKOVIČ, D.; STYC, B. Virus transmission in multicelular organisms. In: MARAMOROSCH, K.; KOPROWSKI, H. **Methods in Virology.** 1 ed. Ed. Academic Press Inc. New York and London, v. 1, p. 179-215, 1967.

BRAUTIGAM, F.E., HIETALA, S.K., GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: Congresso Panamericano De Ciências Veterinárias, 15, 1996, Campo Grande, MS. *Anais...* Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996, p. 284.

BUTTITTA, P. L. Biology of *Toxoplasma hominis* in the guinea pig, mouse and embryonated egg. **Bollettino della Societa` Italiana di Biologia Sperimentale,** v. 27, n. 1-2, p. 83–84, 1951.

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, n. 4, p. 267-279, 1998.

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

CANNAS, A.; NAGULESWARAN, A.; MULLER, N.; EPERON, S.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG 1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. **Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 303-312, 2003.

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

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine

aborted fetuses and experimentally infected mice by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, 2002.

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; LÓPEZ-PÉREZ, I.; ÁLVAREZ-GÁRCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2491-2494, 2006.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZEDA, 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 hots of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 157-159, 2007.

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

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 Medicine Association***,* v. 192, n. 9, p. 1269-85, 1988.

DUBEY, J.P.; DE LAHUNTA, A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. **Applied Parasitology** v. 34, n. 4, p. 229-233, 1993.

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P. Recent advances in Neospora and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3-4, p. 349-367, 1999.

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

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

DUBEY, J. P.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; TUO, W.; VELMURUGAN, G. V.; CONORS, M.; JENKINS, M. C. Neosporosis in Beagles dogs: Clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum.* **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 158-166, 2007.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.146, n. 1, p. 89–97, 2006.

FRENCH, N. P.; CLANCY, D.; DAVISON, H. C.; TREE A. J. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control.

International Journal of Parasitology, v. 29, n. 10, p. 1691-1704, 1999.

FURUTA, P. I.; MINEO, T. W. P.; CARRASCO, A. O. T.; GODOY, G. S.; PINTO A. A.; MACHADO, R. Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infection in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v. 134, n. 14, p. 1931-1939, 2007.

GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p. 23-28, 2004.

GHALMI, F.; CHINA, B.; KAIDI, R.; DAUBE, G.; LOSSON, B. Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 161-167, 2008.

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

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, n. 2, p. 159-161, 2004.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; SOUZA, S. L.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in cattle of the North of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

HIGA, A. C.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; DOMINGUES, L. M.; MALHEIROS, E. B. Evaluation os cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antigens in dogs sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 91-95, 2000.

HILL, D. E.; LIDDELL, S.; JENKINS, C.; DUBEY, J. P. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, 2001.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Review,** v. 6, n. 1, p. 41-61, 2005.

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.

HŮRKOVÁ-HOFMANNOVÁ, L.; VÁCLAVEK, P., ŠKORIČ, M.; FICTUM, P.; MODRÝ, D. Multimammate rat (*Mastomys natalensis*), Tristam's jird (*Meriones tristami*) and Wagner's gerbil (*Gerbillus dasyurus*) as laboratory models of acute neosporosis. **Research in Veterinary Science,** v. 82, n. 3, p. 377-381, 2006.

INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 134, n. 13, p. 1903-1910, 2007.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in rats. **Canadian Journal of Zoology**, v. 68, n. 7, p. 1595-1599, 1990.

MACHADO, R. Z.; MINEO, T. W. P.; LANDIM, L. P.; CARVALHO, A. F.; GENNARI, S. M.; MIGLINO, M. A. Possible role of bovine trophoblast giant cells in transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 21-25, 2007.

McALLISTER, M. M.; HUFFMAN, E. M.; HIETALA, S. K.; CONRAD, P. A.; ANDERSON, M. L.; SALMAN, M. D. Evidence suggesting a point source exposure

in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,** v. 8, n. 3, p. 355-357, 1996.

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

McCANN, C. M.; McALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P.; SMITH, R. F.; CRIPPS, P. J.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 14, p. 1631-1639, 2007.

McGUIRE, A. M., McALLISTER, M. M., WILLS, R. A.; TRANAS, J. D. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora cani*num tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1525–1529, 1999.

MELLO, M. N. e DEANE, M. P. Patterns of development of *Trypanosoma cruzi* in the embryonated chicken egg. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 70, p. 380-388, 1976.

MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; COSTA, G. H. N.; von ANCKEN, A. C. B.; KASPER, L. H.; SOUZA, M. A.; CABRAL, D. D.; COSTA, A. J.; MINEO, J. R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology,** v. 98, n. 4, p. 239-245, 2001.

MINEO, T. W. P.; MARCIANO, J. A.; CARRASCO, A. O. T.; WERTHER, K.; PINTO. A. A.; MACHADO, R. Z. Experimental infection of pingeons (*Columbia*

Livia) by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **In:** 1º SIMPÓSIO SOBRE *NEOSPORA CANINUM* NO BRASIL, 2005, São Paulo, SP... *Anais* do 1º Simpósio sobre *Neospora caninum* no Brasil. Jaboticabal, SP: CBPV, 2005.

MINEO, T. W. P. **Estudo da resposta imune celular e humoral de cães frente a infecção oral por *Neospora caninum***. 2007, 148f. Tese de doutorado apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research,** v. 100, n. 3, p. 633-636, 2007.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.;JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. Phylogenitic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii.* **International Journal for Parasitology,** v. 29, n. 10, p. 1545-1556, 1999.

MÜLLER, N.; VONLAUFEN, N.; GIANINAZZI, C.; LEIB, S. L.; HEMPHILL, A. Application of Real-Time Fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 252-255, 2002.

OMATA, Y.; NIDAIRA, M.; KANO, R.; KOBAYASHI, Y.; KOYAMA, T.; FURUOKA, H.; MAEDA, R.; MATSUI, T.; SAITO, A. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection. **Veterinary Parasitology**. v. 121, n. 3-4, p. 323-328, 2004.

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.

PALAVICINI, P.; ROMERO, J. J.; DOLZ, G.; JIMÉNEZ, A. E.; HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Fecal and serological survey of *Neospora caninum* in farm dogs in Costa Rica. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 265-270, 2007.

PAULA, V. S. O.; RODRIGUES, A. A. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. **Veterinary Research Communications,** v. 28, n. 7, p. 581-585, 2004.

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, n. 1-2, p. 61-66, 2007.

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, n. 1-2, p. 159-163, 2007.

PETERS, M.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. **Parasitology Research**, v. 86, n.1, p. 1-7, 2000.

PETERS, M, LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology,** v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.

QUE, X.; WUNDERLICH, A.; JOINER, K. A.; REED, S. L. Toxopian-1 is critical for infection in a novel chicken embryo model of congenital toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2915-2921, 2004.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T.; DUBEY, J. P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 308-312, 2007.

RETTINGER, C.; LECLIPTEUX, T.; DE MEERSCHAN, F.; FOCANT, C.; LOSSON,B. Survival, immune response and tissue cyst production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) strains of mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary Research**, v.35, n. 2, p. 225-232, 2004.

RISCO-CASTILLO, V.; FERNÁNDEZ-GARCIA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Comparative analysis of stress agents in a simplified *in vitro* system of *Neospora caninum* bradyzoite production. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 466-470, 2004.

ROIRON, V.; GALISTIN, P. Culture of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus* in the embryonated egg. **Revue de Pathologie Générale et de Physiologie Clinique**, v. 63, p. 267-273, 1963.

SANTOS, A. P. M. E. Diagnóstico imuno- histoquímico do *Neospora caninum* em rebanho bovino leiteiro da região norte do Paraná. 2000, 92p. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

SAWADA, M.; PARK, C.; MORITA, T.; SHIMADA, A., UEMURA, T.; HIRATANI, M. Pathological findings of nude mice inoculated with bovine *Neospora.* **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 10, p. 947-948, 1997.

SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I.; MARTÍNEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; del-POZO. I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology.** v. 67, n. 6, p. 1175-1184, 2007.

SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. Pathological and Immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum.* **Veterinary Pathology,** v. 36, n. 4, p. 321-327, 1999.

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

TEIXEIRA, L.; BOTELHO, A. S.; BATISTA, A. R.; MEIRELES, C. S.; RIBEIRO, A.; DOMINGUES, H. S.; CORREIA DA COSTA, J. M.; CASTRO, A. G.; FAUSTINO, A. M. R.; VILA NOVA, M. Analysis of the immune response to *Neospora caninum* in a modelo of intragastric infection in mice. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 1, p. 23-36, 2007.

VÁCLAVEK, P.; SEDLÁK, K.; HŮRKOVÁ, L.; VODRÁŽKA, P.; ŠEBESTA, R.; KOUDELA, B. Serelogical survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 35-41, 2006.

VITALIANO, S. N.; SILVA, D. A.O.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from

Southeastern and Midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology,** v. 122, n. 4, p. 253-260, 2004.

WARREN, J. e RUSS, S. B. Cultivation of Toxoplasma in embryonated eggs- an antigen derived from chorioallantoic membrane. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 67, p. 85-89, 1948.

WUNDERLIN, E.; WILD, P.; ECKERT, J. Comparative reproduction of *Cryptosporidium baileyi* in embryonated eggs and chickens. **Parasitology Research**, v. 83, n. 7, p. 712-715, 1997.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo