

CARLOS HENRYQUE DE SOUZA E SILVA

**ESTUDO DA TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Neospora
caninum* EM OVELHAS DESLANADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

CARLOS HENRYQUE DE SOUZA E SILVA

ESTUDO DA TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Neospora caninum* EM OVELHAS DESLANADAS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 18 de novembro de 2005.

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Co-orientadora)

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Prof. José Dantas Ribeiro Filho

Prof. Sérgio de Oliveira de Paula

Prof. Joaquim Herman Patarroyo Salcedo
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro e Eliana, meus irmãos Gustavo, Priscila e Camila e todos os meus familiares, os quais, apesar da distância sempre me apoiaram.

Aos professores Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo e Marlene Isabel Vargas Vilorio, por acreditarem em mim e pelos grandes ensinamentos que levarei por toda minha vida.

Aos meus amigos Angelo, Gustavo, Marquinho e Pedro da banda The Dark Side pelos momentos de alegria em cima e fora dos palcos e por sempre estarem sempre ao meu lado.

Aos meus companheiros de trabalho, Carol, Carolzinha, Luana, Bruna, Flávia, Ana Paula, Ferdinan, Cláudia, Irma, Rayane, Regina, Márcio Antonio, Sidimar, Javier, Diogo, Marcinho, Cauzinho, José Carlos, Cláudio, Adão e Rose, enfim, todos aqueles que, independente de serem funcionários, colegas de graduação, pós-graduação ou laboratório, me ensinaram muito a crescer profissionalmente.

À cidade de Viçosa por me acolher e fazer a minha estadia longe de casa bem mais fácil.

Ao Departamento de Medicina Veterinária, ao Instituto de Biologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) e à Universidade Federal de Viçosa pelo suporte estrutural indispensáveis para a realização deste trabalho por contribuírem na minha formação científica.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro no final deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Biologia.....	4
2.2 Hospedeiros e Fontes de Infecção.....	5
2.3 Ciclo Biológico.....	6
2.4 Sinais Clínicos.....	7
2.5 Imunologia da Neosporose.....	8
2.5.1. Gestação X Neospora.....	9
2.6 Patogenia e Lesões.....	10
2.7 Diagnóstico.....	11
2.8 Tratamento.....	13
2.9 Epidemiologia.....	13
2.10 Controle.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Local.....	18
4.2 Animais.....	18
4.3 Amostra do Agente.....	20
4.4 Coleta de Amostras.....	20
4.5 Preparação dos Cortes Histopatológicos.....	21
4.6 Imunohistoquímica.....	21
4.7 Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti- <i>N. caninum</i>	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Histopatologia.....	24
5.2 Imunohistoquímica.....	31
5.3 Imunofluorescência para detecção de Anticorpos anti- <i>N. caninum</i>	31
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Neospora caninum</i>	7
Figura 2 - Lesões observadas em diferentes tecidos dos filhotes provenientes da segunda gestação.....	28
Figura 3 - Lesões observadas em diferentes tecidos dos filhotes provenientes da terceira gestação.....	29
Figura 4 - Lesões observadas em diferentes tecidos dos filhotes provenientes da quarta gestação.....	30
Figura 5 - Cistos teciduais encontrados em ovelhas inoculadas, corados pelo método PAP.....	31
Figura 6 - Reação de imunofluorescência indireta para <i>Neospora caninum</i>	32

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Identificação das ovelhas e estágio reprodutivo no momento da inoculação.....	19
Tabela 2 – Sexo e idade das crias no momento da necropsia.....	21
Tabela 3 – Principais alterações histopatológicas encontradas em ovelhas inoculadas com <i>Neospora caninum</i> e suas respectivas crias de três gestações consecutivas.....	27

RESUMO

SILVA, Carlos Henrique de Souza e M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2005. **Estudo da transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas deslanadas.** Orientador: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilória e Jackson Victor de Araújo.

Neospora caninum é um protozoário importante por causar abortamento em bovinos em todo o mundo. O seu ciclo biológico completo foi descrito em 1998, tendo como hospedeiros definitivos os canídeos e entre os hospedeiros intermediários os herbívoros. A principal forma de permanência da infecção nos rebanhos é pela via transplacentária. Ovelhas infectadas experimentalmente são utilizadas como modelo da neosporose bovina e para se estudar a transmissão vertical e a patologia da infecção nas várias gestações subseqüentes, sendo utilizadas sete ovelhas adultas e seus respectivos filhotes de segunda, terceira, quarta e quinta gestações com diferentes idades. Lesões características de neosporose foram encontradas nos animais estudados, compreendendo focos inflamatórios não-supurativos no fígado, cérebro e pulmão, além de infiltrado inflamatório mononuclear perivascular nos mesmos, principalmente nos filhotes da segunda gestação. Além disso, observaram-se cistos teciduais de *Neospora caninum* na língua e coração de ovelhas adultas. Comprovou-se através de imunofluorescência indireta que todos os animais apresentaram-se positivos à infecção. Estes dados demonstram que o parasita é transmitido verticalmente durante várias gestações, causando lesões características, o que pode em condições naturais manter a infecção no rebanho sem, no entanto, causar a morte fetal.

ABSTRACT

SILVA, Carlos Henryque de Souza M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2005. **Vertical transmission study of *Neospora caninum* in hair sheep**. Adviser: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Co-advisers: Marlene Isabel Vargas Vilória and Jackson Victor de Araújo.

Neospora caninum is an important protozoan cause of abortion in cattle worldwide. The whole life cycle was described in 1998, had canids as definitive hosts and herbivores as intermediate hosts. The main pattern of persistent infection in herds it is by transplacental route. Sheep experimentally infected are used as a model of bovine neosporosis and to study vertical transmission and the pathology of infection at several subsequent gestations, being used seven ewes and their respective offspring at second, third, fourth and fifth pregnancies with different ages. Typical neosporosis lesions were found in the studied animals, consisting of non-suppurative inflammatory focuses on liver, brain and lungs, besides mononuclear perivascular infiltrate, principally on lambs of second gestation. Moreover, *Neospora caninum* tissues cysts were observed on the tongue and heart of adult sheep. It was proved by indirect immunofluorescence that all the animals were positives to the infection. These data demonstrate the parasite is vertically transmitted during several pregnancies, causing characteristic lesions, which, in natural conditions, keep the infection in herd without, nevertheless, to induce fetal death.

1. JUSTIFICATIVA

Neospora caninum é um protozoário parasita causador da neosporose, o qual era identificado erroneamente como *Toxoplasma gondii* antes de 1984, sendo reconhecido e classificado como uma nova espécie em 1988 (DUBEY, 1988; DE MAREZ *et al.*, 1999; BUXTON *et al.*, 2002).

Este parasita despertou interesse mundial por ser reconhecido como o agente causador de abortamento em bovinos (DUBEY & LINDSAY, 1996; BARBER & TREES, 1998; DAVISON *et al.*, 1999).

A neosporose apresenta ampla distribuição mundial podendo ser considerada uma doença emergente. Afeta outros ruminantes como ovelhas e cabras, razão pela qual o estudo experimental da infecção em ovelhas permite conhecer alguns mecanismos fisiopatológicos do comportamento da doença nesta espécie animal além de que pode ser utilizada como um modelo da neosporose bovina.

No presente trabalho optou-se pelo uso de ovelhas deslanadas devido à sua importância econômica nos países tropicais por serem animais bem adaptados às condições climáticas nestes países, estando um dos maiores rebanhos das Américas na região Nordeste do Brasil (RAJAB *et al.*, 1992).

Pesquisas com modelos experimentais em ovinos realizadas até então, analisaram apenas a primeira e a segunda geração originadas de animais infectados. Entretanto, no presente trabalho as observações vão além, analisando as alterações causadas pela neosporose em gestações subseqüentes, dando informações mais detalhadas sobre o comportamento da infecção em ovinos deslanados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Neosporose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário apicomplexo *Neospora caninum*, o qual foi identificado recentemente como uma das principais causas de abortamento em bovinos (DUBEY & LINDSAY, 1996; DAVISON *et al.*, 1999; FRENCH *et al.*, 1999).

Além de bovinos, a neosporose afeta cães e é caracterizada pelo comprometimento do sistema nervoso central nesses animais (DUBEY & LINDSAY, 1996; BARBER & TREES, 1998; DUBEY *et al.*, 1998a).

A sua classificação taxonômica é:

Sub reino: Protozoa

Filo: Apicomplexa

Classe: Sporozozoida

Ordem: Eucoccidiorida

Família: Sarcocystidae

Gênero: *Neospora*

Espécie: *N. caninum*

N. hughesi

(MUGRIDGE *et al.*, 1999, MARSH *et al.*, 1998, JONES *et al.*, 2000)

O primeiro relato sobre o agente foi feito por BJERKAS em 1984 ao constatar que cães da raça Boxer apresentavam organismos semelhantes

ao *Toxoplasma gondii*. Em um estudo retrospectivo com cérebros incluídos em parafina, DUBEY caracterizou tais organismos como um novo gênero (*Neospora*) e a nova espécie (*N. caninum*) (DUBEY *et al.*, 1988).

O primeiro relato de abortamento em bovinos relacionado ao *N. caninum* foi feito por THILSTED & DUBEY em 1989 ao identificarem organismos semelhantes a este protozoário em cérebro de fetos abortados provenientes de um rebanho leiteiro.

Em 1990, BARR *et al.* afirmaram ser a neosporose a principal causa de abortamento em vacas leiteiras na Califórnia. Um ano mais tarde, BJERKAS & DUBEY (1991) identificaram em cães cepas idênticas àquelas isoladas em bovinos.

Apesar de o *Neospora caninum* ter sido reconhecido em 1988, somente em 1998 McALLISTER *et al.* conseguiram demonstrar que o cão era o hospedeiro definitivo e, portanto, fechando assim o ciclo biológico do parasita. Em 2004, GONDIM *et al.* demonstraram que o coioete também eliminava oocisto nas fezes, sendo igualmente reconhecido como hospedeiro definitivo.

2.1 Biologia

O *N. caninum* pode ser encontrado em três diferentes estágios: taquizoítos, cisto tecidual (o qual contém bradizoítos) e oocistos (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 2002).

Os taquizoítos podem ser encontrados nas formas ovóide ou lunar, com dimensões entre 3 e 7 x 1 a 5 µm, variando de acordo com o estágio de divisão (DUBEY & LINDSAY, 1996). Podem infectar vários tipos celulares (macrófagos, neurônios, fibroblastos, células musculares e hepatócitos), instalando-se dentro de um vacúolo parasitóforo e proliferando por endodiogenia (DUBEY & LINDSAY, 1996). Esta proliferação de taquizoítos na célula leva à formação de um pseudocisto, que lisa a célula liberando os protozoários que infectarão as células adjacentes.

O cisto tecidual geralmente apresenta uma forma oval e parede de até 4 µm de espessura, variando de acordo com a duração da infecção (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.* 2002). Pode ser diferenciado do

Toxoplasma gondii por este possuir cisto tecidual de parede delgada (menos de 0,5 μm); contém bradizoítos (forma latente do organismo) e geralmente é encontrado no sistema nervoso central (DUBEY & LINDSAY, 1996). Os bradizoítos contidos nesse cisto são elípticos ou ovóides, medem 7,3 x 1,5 μm , apresentando 6 a 12 roptrias e várias outras estruturas típicas de um apicomplexo (micronemas, complexo apical, grânulos de amilopectina e grânulos eletron-densos) (JARDINE, 1996).

Os oocistos são esféricos, apresentam dimensões de 11,7 x 11,3 μm e contém, na maioria dos casos, dois esporocistos. Cada esporocisto possui quatro esporozoítos de 6,5 x 2 μm . O oocisto apresenta estágios entero-epiteliais no cão, porém ainda não foram totalmente esclarecidos (LINDSAY *et al.*, 1999; DUBEY *et al.*, 2002). *Neospora caninum* e *Hammondia heydorni* apresentam oocistos morfológicamente indistinguíveis, porém técnicas de diagnóstico molecular e seqüenciamento de DNA são capazes de diferenciar esses dois gêneros (SLAPETA *et al.*, 2002).

2. 2 Hospedeiros e Fontes de Infecção

Evidência de infecção natural com *N. caninum* tem sido observada em cães, bovinos, ovelhas, cabras, cavalos e cervos (DUBEY & LINDSAY, 1996; MARSH *et al.*, 1996; SAWADA *et al.*, 2000; DUBEY *et al.*, 2002; GENNARI *et al.*, 2002). Anticorpos para *N. caninum* foram demonstrados em soro de búfalos (DUBEY *et al.*, 1998), coiotes (LINDSAY *et al.*, 1996), raposas (SIMPSON *et al.*, 1997) lobos-guará (VITALIANO *et al.*, 2004) e camelos (HILALI *et al.*, 1998) expostos naturalmente, sugerindo que estes animais são igualmente hospedeiros intermediários naturais para *N. caninum*.

Infecções experimentais têm sido induzidas em camundongos (LINDSAY & DUBEY, 1990a), ratos (LINDAY & DUBEY, 1990b), cães (DUBEY *et al.*, 1988), cabras (LINDSAY *et al.*, 1995), ovelhas de lã da raça Rambouillet (McALLISTER *et al.*, 1996; JOLLEY *et al.*, 1999), ovelhas deslanadas do cruzamento das raças Morada Nova e Santa Inês (OVIDO *et al.*, 2003), coiotes (LINDSAY *et al.*, 1996; GONDIM *et al.*, 2004), bovinos

(BARR *et al.*, 1994b), suínos (JENSEN *et al.*, 1998), gerbils (DUBEY & LINDSAY, 2000), dentre outros.

O potencial de *N. caninum* para infectar humanos é desconhecido (TRANAS *et al.*, 1999). Até a presente data, há a constatação de que 5% de mulheres gestantes com histórico de abortamento e 3,8% de gestantes sem histórico de abortamento, além de 15% de indivíduos com AIDS apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* na cidade de Salvador, Bahia, Brasil (ALMEIDA, 2004).

Hospedeiros susceptíveis podem infectar-se por ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos (DE MAREZ *et al.*, 1999). A transmissão vertical (infecção transplacentária) de *N. caninum* tem sido relatada em bovinos (DUBEY, 1989), ovelhas de lã (McALLISTER *et al.*, 1996), ovelhas deslanadas (OVIEDO, 2001), cabras (LINDSAY *et al.*, 1995), camundongos (COLE *et al.*, 1995a), cães (COLE *et al.*, 1995b; BARBER & TREES, 1998), cervos (DUBEY *et al.*, 1996) e primatas (BARR *et al.*, 1994b).

2.3 Ciclo Biológico

Os hospedeiros que foram reconhecidos como definitivos são os cães e os coiotes (acredita-se que outros canídeos também possam eliminar oocistos nas fezes), enquanto os hospedeiros intermediários sejam provavelmente todos os animais de sangue quente (LINDSAY *et al.*, 1999; DIJKISTRA *et al.*, 2001; ALMERÍA *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2004).

O canídeo se infecta ao ingerir água contaminada com oocistos esporulados ou alimentos contendo cistos teciduais. Em torno de cinco dias estes animais liberam oocistos não esporulados nas fezes, os quais esporulam dentro de 24 horas sob condições ótimas, tornando-se infectivos para o hospedeiro intermediário ao ingerir água ou pasto e restos placentários contaminados com esta forma (LINDSAY *et al.* 1999; DE MAREZ *et al.*, 1999) (Figura 1).

Os esporozoítos liberados pelos oocistos transformam-se em taquizoítos, os quais penetram nas células do hospedeiro, podendo

atingir, no caso de fêmeas gestantes, o feto, e induzindo o abortamento ou o nascimento de animais infectados (BARBER & TREES, 1998; DAVISON *et al.*, 1999; STENLUND *et al.*, 1999; INNES *et al.*, 2002).

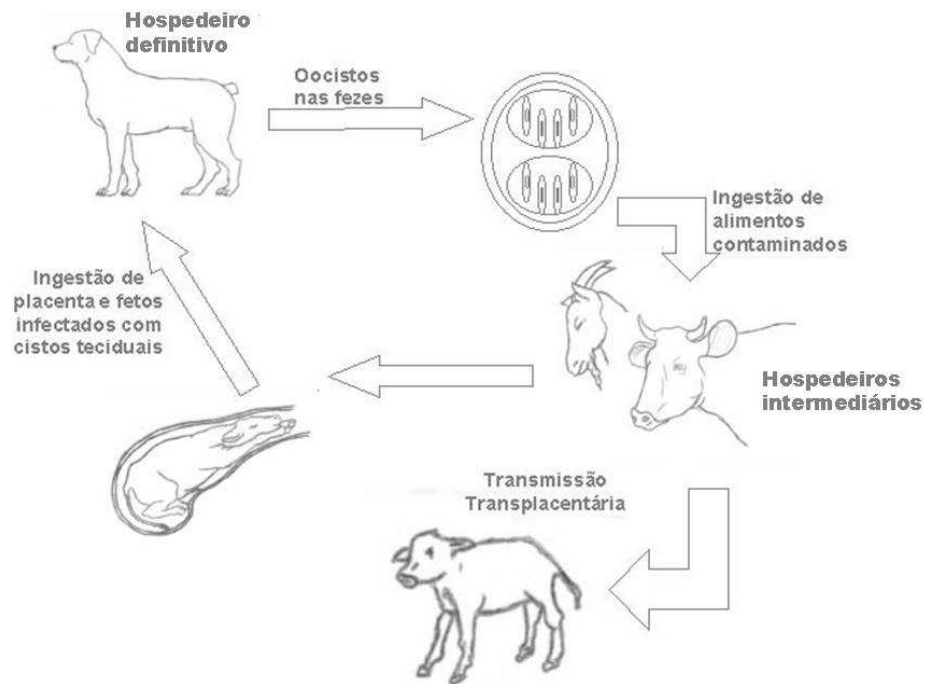


Figura 1: Ciclo biológico do *Neospora caninum*

2.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos mais evidentes ocorrem em animais jovens infectados (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 1998; BUXTON *et al.*, 2002).

Em cães, a proporção entre indivíduos que apresentam sinais clínicos e aqueles infectados sem manifestação clínica é muito baixa (BUXTON *et al.*, 2002), sendo os sinais neurológicos mais comuns, variando de acordo com o local parasitado: paresia principalmente dos membros posteriores, evoluindo para uma paralisia; paralisia de mandíbula; dificuldade de deglutição; flacidez e hipotrofia muscular (DUBEY & LINDSAY, 1996;

DUBEY *et al.*, 1998; BUXTON *et al.*, 2002). Além disso, a neosporose também pode se manifestar com quadros de miocardite, pneumonia e dermatite (DUBEY & LINDSAY, 1996; BUXTON *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2003).

Nos bovinos adultos, o abortamento é a única manifestação clínica que pode ser observada, porém há casos relatados de reabsorção fetal, mumificação, ou ainda, nascimento de filhotes fracos ou clinicamente normais, porém infectados (DUBEY & LINDSAY, 1996; TREES *et al.*, 1999; BUXTON *et al.*, 2002). Nestes filhotes nascidos infectados, podem aparecer sinais neurológicos como ataxia, perda de propriocepção, ocorrendo casos de exoftalmia e outras anormalidades relacionadas ao comprometimento das células nervosas embrionárias (DUBEY & LINDSAY, 1996).

Em caprinos e ovinos os sinais clínicos são semelhantes àqueles descritos para os bovinos, tais como: abortamento, natimortos, nascimento de animais fracos, com hidrocefalia ou normais clinicamente, porém infectados (DUBEY & LINDSAY, 1996; JOLLEY *et al.*, 1999; OVIEDO *et al.*, 2002). Em infecções experimentais demonstrou-se que ovelhas de lã da raça Rambouillet e ovelhas deslanadas das raças Santa Inês e Morada Nova apresentam os mesmos sinais clínicos da neosporose bovina, sendo, portanto, usadas como modelo para o estudo da neosporose bovina (JOLLEY *et al.*, 1999; OVIEDO *et al.*, 2003).

2.5 Imunologia da Neosporose

Pode-se dizer que fatores imunológicos influenciem nos mecanismos de perda fetal e de transmissão vertical do parasita (QUINN *et al.*, 2002).

Os bovinos geralmente mostram poucos sinais clínicos após a infecção com *N. caninum*; o que tem sido relatado é a presença de uma resposta imune celular com produção de IFN- γ tanto em animais naturalmente infectados, quanto em animais experimentalmente infectados (KHAN *et al.*, 1997; QUINN *et al.*, 2002; INNES *et al.*, 2002).

Portanto, a resposta imune ao *N. caninum*, igual a outros parasitas intracelulares, é dominada pela resposta do tipo Th1 (SMITH, 1996; KHAN *et al.*, 1997; QUINN *et al.*, 2002; INNES *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2003).

Muitos estudos têm sido feitos em camundongos para tentar conhecer a cinética da resposta imune contra *N. caninum*, através do bloqueio ou administração de citocinas durante uma infecção (KHAN *et al.*, 1997; QUINN *et al.*, 2002; BUXTON *et al.*, 2002). A neutralização de IL-12 e IFN- γ *in vivo* com anticorpos aumenta a susceptibilidade à infecção, levando à mortalidade. O óxido nítrico também é importante na resistência de camundongos à doença, sendo que em animais deficientes em iNOS, a susceptibilidade à infecção é maior (KHAN *et al.*, 1997; QUINN *et al.*, 2002; BUXTON *et al.*, 2002).

2.5.1. Gestação X *Neospora*

A gestação representa uma situação estranha para o sistema imune da gestante, porque a mãe carrega uma espécie de “enxerto alógeno” (feto) sem que ocorra uma reação de rejeição (INNES *et al.* 2002).

Algumas citocinas na interface materno-fetal são benéficas para a gestação, enquanto outras não. Por exemplo, as citocinas tipo Th1 ou pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-2) comprometem o feto, enquanto citocinas do tipo Th2 (IL-10, TGF- β , IL-4 e IL-5), que são produzidas nessa interface agem de forma contrária às citocinas tipo Th1 (SMITH, 1996; RAGHUPATHY, 1997; QUINN *et al.*, 2002).

Sabe-se que os hormônios produzidos durante a gestação têm efeitos imunomoduladores. O mais importante é a progesterona, a qual leva a uma resposta do tipo Th2, além de induzir a produção de IL-4 (RAGHUPATHY, 1997; ROBERTS *et al.*, 2001; QUINN *et al.*, 2002). A prostaglandina E₂ estimula células dendríticas a produzirem IL-10, e isso induz a marcação de células T *naïve* com um perfil Th2, o qual inibe a produção de óxido nítrico, TNF- α e células *natural killer* (QUINN *et al.*, 2002; INNES *et al.* 2002).

Em estudos com vacas gestantes foi observado que a concentração sérica de progesterona aumenta durante a gestação e cai no final da mesma, acontecendo o inverso com a resposta do tipo Th1 (INNES *et al.* 2002).

Porém o problema ocorre quando uma vaca gestante é infectada com *N. caninum*, pois ao mesmo tempo em que as citocinas Th1 limitam a

multiplicação do parasita, elas podem levar à rejeição ou abortamento do feto (QUINN *et al.*, 2002; INNES *et al.* 2002).

Além disso, as células trofoblásticas do feto produzem IL-10 criando um ambiente Th2 na interface materno-fetal. A IL-10 deprime a produção de IFN- γ , o que favorece a multiplicação do parasita (RAGHUPATHY, 1997; QUINN *et al.*, 2002; INNES *et al.* 2002).

Então, a situação que é encontrada durante a gestação é um desequilíbrio na interação hospedeiro-parasita, o que pode explicar a patogenia da doença. A resposta imune contra a infecção vai influenciar no sucesso da gestação, visto que a imunomodulação que ocorre durante a gestação pode afetar a habilidade da gestante para enfrentar a infecção.

O que se tem observado é que o período da gestação no qual o animal foi infectado é importante para o destino da gestação (QUINN *et al.*, 2002; INNES *et al.* 2002; BUXTON *et al.*, 2002). Se a vaca prenha foi infectada no primeiro terço da gestação é muito provável que ocorra morte fetal, porque além da forte resposta celular imunomediada da mãe, os órgãos linfóides do feto estão ainda em formação. Porém, se ela foi infectada no terço médio, ocorre imunomodulação da resposta celular, e o feto apresenta uma resposta imune rudimentar, mas mesmo assim não é suficiente para neutralizar a infecção, ocorrendo abortamento ou nascimento de um animal com sinais clínicos da doença. Se a vaca é infectada no terço final da gestação, o feto é capaz de uma defesa crescente contra o protozoário, levando à sua sobrevivência (INNES *et al.* 2002; BUXTON *et al.*, 2002).

2.6 Patogenia e Lesões

As lesões causadas pela neosporose são dependentes do equilíbrio entre os taquizoítos, os quais penetram nas células do hospedeiro, e a capacidade do hospedeiro controlar a multiplicação do parasita (BUXTON *et al.*, 2002).

Portanto, quando uma vaca gestante se infecta, ocorre um desequilíbrio na interação hospedeiro-parasita, levando à destruição focal dos tecidos da interface materno-fetal (placentoma) por parte do parasita, e

início de uma resposta inflamatória local por parte da vaca gestante (BUXTON *et al.*, 2002).

O *N. caninum* tem a habilidade de infectar qualquer tipo celular, porém é mais comumente encontrado no sistema nervoso central (SNC), coração e músculo esquelético; lesões também são observadas no fígado, pulmão e pele (JONES *et al.*, 2000; BUXTON *et al.*, 2002).

Ao alcançar a corrente sangüínea do feto, os taquizoítos penetram principalmente no tecido nervoso provocando destruição celular generalizada, com pouco ou quase nenhum foco inflamatório, no caso de fetos pouco desenvolvidos (BUXTON *et al.*, 2002). Em fetos mais desenvolvidos podem-se observar gliose e infiltrado mononuclear limitando uma área central de necrose no SNC, lesões hepáticas (focos de necrose e infiltrado mononuclear periportal); além disso, também são relatados casos de pneumonia, nefrite, miocardites e miosites (DUBEY & LINDSAY, 1996; BUXTON *et al.*, 2002).

Em cães foram observadas necroses no SNC e no fígado, granulomas e dermatite ulcerativa (DUBEY & LINDSAY, 1996), além de áreas de miosite não-supurativa no coração e músculo esquelético, observando-se taquizoítos associados às lesões (DUBEY *et al.*, 1998). Ainda, no SNC têm sido observados encefalites caracterizadas por manguito perivascular e infiltrado mononuclear no parênquima nervoso (DUBEY *et al.*, 1998).

Infecções experimentais em camundongos, gerbils, ovelhas e cabras também revelam lesões características de neosporose, incluindo, dentre outras, encefalite, meningite e pneumonia (OVIEDO, 2001; BUXTON *et al.*, 2002).

2.7 Diagnóstico

Por ser a neosporose uma doença emergente que afeta animais em todo o mundo, é necessário um diagnóstico preciso para se comprovar ou descartar a presença do parasita no animal; além disso, é fundamental para que sejam adotadas medidas adequadas de controle e estabelecer a epidemiologia da infecção (BOGER & HATTEL, 2003).

Um histórico clínico do animal pode ajudar no diagnóstico *ante mortem* (DUBEY & LINDSAY, 1996; CAETANO-da-SILVA, 2004). Em cães jovens de uma mesma ninhada, uma paralisia progressiva pode indicar suspeita de neosporose (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 1998). No caso de bovinos, um histórico de abortamento, repetição de cio ou nascimento de animais fracos podem ser considerados casos suspeitos de neosporose.

Porém, apenas com a observação dos sinais clínicos não se pode confirmar uma suspeita da doença. Testes sorológicos são utilizados não só para se estudar a epidemiologia, mas também para diagnosticar a doença (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.* 1998; STENLUND *et al.*, 1999; REICHEL & PFEIFFER, 2002; CAETANO-DA-SILVA, 2004).

O primeiro teste sorológico desenvolvido foi a imunofluorescência indireta em 1988 por J. P. Dubey (DUBEY & LINDSAY, 1996). A imunofluorescência indireta é a técnica mais comumente usada, sendo considerada como o “padrão ouro” (gold standard) dos diagnósticos sorológicos apesar de ser um teste subjetivo (DUBEY & LINDSAY, 1996; REICHEL & PFEIFFER, 2002), sendo necessários técnicos treinados para executá-los.

O ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) é outro teste amplamente utilizado, por ser altamente específico já que se usam proteínas purificadas específicas de *N. caninum* (DUBEY & LINDSAY, 1996).

O NAT (*Neospora* agglutination test) é um teste de aglutinação direta e de simples execução que também pode ser utilizado, não sendo necessário um anticorpo secundário marcado (CANADA *et al.*, 2004).

O Western Blotting ou immunoblotting não é uma técnica de rotina, mas possui alta sensibilidade e especificidade (CAETANO-DA-SILVA, 2004).

Outra técnica que apresenta alta sensibilidade e especificidade é a reação em cadeia de polimerase (PCR – polymerase chain reaction), a qual identifica e quantifica o DNA de *N. caninum* presente em tecidos e até mesmo em sêmen de animais infectados (DUBEY *et al.*, 1998; ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004).

Atualmente, o principal método de diagnóstico de neosporose é a observação microscópica de lesões nos tecidos, especialmente cérebro (DUBEY *et al.*, 1998; SAWADA *et al.*, 2000; MACALDOWIE *et al.*, 2003;

OVIEDO, 2003). A confirmação deve ser feita mediante a utilização de provas imunohistoquímicas, por exemplo, PAP (peroxidase anti-peroxidase) para identificação de taquizoítos e cistos teciduais (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 1998; SAWADA *et al.*, 2000; MACALDOWIE *et al.*, 2003; OVIEDO, 2003).

Pode-se, ainda, inocular camundongos ou culturas *in vitro* de *N. caninum* a partir de amostras teciduais de animais com suspeita de infecção (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 1998; SAWADA *et al.*, 2000; CAETANO-DA-SILVA, 2004).

2.8 Tratamento

A neosporose clínica pode ser tratada com drogas antiparasitárias apenas em cães, pois em bovinos não é economicamente viável.

Em cães, a resposta ao tratamento depende do estágio no qual a infecção se encontra. Várias drogas têm sido testadas, apresentando resultados satisfatórios (DUBEY *et al.*, 1998). Clindamicina (Antirobe – 12,5 – 18,5 mg/kg de peso corporal) pode ser administrada oralmente duas vezes ao dia por dez dias (DUBEY *et al.*, 1998).

Pode-se usar uma combinação de Trimetoprim e sulfadiazina (Tribrissen, 15 mg/kg, duas vezes ao dia) e pirimetamina (Daraprim – 1 mg/kg diariamente) por quatro semanas, revertendo a paralisia em alguns cães com neosporose (MAYHEW *et al.*, 1991 e McGLENNON *et al.*, 1990 citado por DUBEY & LINDSAY, 1996).

2.9 Epidemiologia

A neosporose tem ampla distribuição mundial, sendo que na América do Sul a prevalência da infecção vem aumentando nos últimos anos, seja pelo trânsito de animais infectados entre os países, seja pelo desenvolvimento de testes diagnósticos, os quais revelam casos de neosporose que antes não tinham sido diagnosticados.

Na Argentina foram encontrados 4,2% de positividade em rebanhos de bovinos de corte e 16,6% em vacas leiteiras, sendo que 92,5% das

fazendas leiteiras sem antecedentes de infecção por *N. caninum* e 52,9% das fazendas de corte estavam positivas (MOORE *et al.*, 2002). Na província de Buenos Aires foram encontrados 48%, 54,2% e 26,2% de cães soropositivos localizados em áreas rurais com atividade leiteira, corte e provenientes de hospital veterinário, respectivamente (BASSO *et al.*, 2001).

No Brasil constatou-se que 10% dos cães domésticos e 25% dos cães de rua da cidade de São Paulo são positivos para *N. caninum* (GENNARI *et al.*, 2002), e que 8,3% dos cães da cidade de Monte Negro, Rondônia, apresentavam anticorpos anti-*N. caninum*, sendo a maioria alimentados com comida caseira (CAÑON-FRANCO *et al.*, 2003). Amostras sangüíneas de lobos-guará coletadas em seis zoológicos e em uma reserva ecológica (Araxá – MG) indicaram 8,5% de soropositividade, demonstrando a exposição de animais silvestres à infecção com *N. caninum* (VITALIANO *et al.*, 2004).

Em vários estudos epidemiológicos realizados com rebanhos leiteiros foi observada uma variação de 11% a 35% de animais soropositivos, constatando alta prevalência associada a casos de abortamento nos rebanhos (GONDIM *et al.*, 1999^a; GONDIM *et al.*, 1999^b; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001; CORBELLINI *et al.*, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2004; MOORE, 2005).

Na Colômbia, num total de 357 soros de vacas leiteiras com histórico de aborto e negativas para brucelose, provenientes de regiões da Sabana de Bogotá, regiões de clima quente e Nariño, 54,1% tinham títulos considerados positivos para *N. caninum* (ZAMBRANO *et al.*, 2001).

Em diferentes regiões do Paraguai foi observado, de um total de 879 bovinos de corte e leiteiros, 29,8% de soropositividade, sendo que em um dos rebanhos, o qual apresentava casos persistentes de abortamento, foram observados 56,7% de animais positivos para o parasita (OSAWA *et al.*, 2002).

No Peru, de 275 amostras de sangue de lhamas fêmeas, provenientes da província de Melgar, $16,7 \pm 4,4\%$ (46/275) se mostraram positivas (MOYA *et al.*, 2003). No Vale de Lima, outro estudo demonstrou que 32,7% dos cães de 23 propriedades leiteiras eram positivos para *N. caninum* (del CAMPO *et al.*, 2003). Já na província de Chachapoyas,

HORNA *et al.* (2003) encontraram uma prevalência de 28,9% de cães positivos. Ainda no Vale de Lima, RIVERA *et al.* (2000) encontrou 62,1% de positividade num total de nove rebanhos leiteiros.

Em um rebanho leiteiro do Uruguai foi observado que 61,3% de vacas e 22,6% dos bezerros nascidos dessas vacas eram soropositivos (KASHIWAZAKI *et al.*, 2004).

2.10 Controle

Para se adotar medidas efetivas de controle é necessário que se conheça a epidemiologia da transmissão do parasita aos animais.

Em um modelo matemático elaborado por FRENCH *et al.* (1999), foram consideradas várias estratégias de controle, medindo-se o impacto das mesmas na prevalência da infecção em um rebanho leiteiro: separação dos bovinos infectados; não-reposição desses animais infectados; prevenção da transmissão dentro do rebanho evitando a administração de colostro ou leite de vacas infectadas para os bezerros e prevenção do contato com fontes externas de transmissão horizontal, tais como: cão infectado e fezes possivelmente contaminadas com oocistos.

A medida que se tem mostrado mais efetiva é a separação dos animais infectados, a qual reduz rapidamente a prevalência da infecção (FRENCH *et al.*, 1999; DUBEY, 2003; HALL *et al.*, 2005). A não-reposição dos animais infectados também é uma medida que diminui a prevalência, porém é menos efetiva do que a primeira (FRENCH *et al.*, 1999). Entretanto, para se eliminar a infecção, a única medida a ser tomada é a eliminação de fontes externas de transmissão (FRENCH *et al.*, 1999).

De fato, foi demonstrado que a presença de cães em fazendas aumenta a prevalência da infecção (RINALDI *et al.*, 2005). Além disso, cães alimentados com placenta eliminam oocistos nas fezes, porém não quando se alimentam de fetos abortados (DIJIKSTRA *et al.*, 2001; DIJIKSTRA *et al.*, 2002; DUBEY, 2003). Portanto, deve-se evitar que cães em propriedades rurais se alimentem de bezerros mortos e principalmente membranas fetais (DUBEY, 2003), além de evitar que os mesmos tenham acesso aos locais de

armazenamento de alimentos para o gado - silos e cochos (DIJKSTRA *et al.*, 2002)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a transmissão vertical de *Neospora caninum* em um rebanho fechado de ovelhas deslanadas *Ovis aries* cronicamente infectadas.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar sorologicamente cordeiros da segunda, terceira, quarta e quinta gestações em relação à presença de anticorpos IgG anti - *N. caninum*.
2. Análise anatomo-histopatológica dos fetos abortados bem como de carneiros da segunda, terceira e quarta gestações em diferentes faixas etárias.
3. Análise do sistema nervoso e anexos placentários de cordeiros eutanasiados, bem como de fetos e suas mães, para a constatação da presença ou ausência de cistos teciduais de *N. caninum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) e no Laboratório de Histopatologia pertencente ao Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.2 Animais

Em março de 2001, 11 ovelhas deslanadas *Ovis aries* (cruzamento das raças Santa Inês e Morada Nova), provenientes do setor de ovinocultura da UFV, foram inoculadas por via intravenosa com taquizoítos de *Neospora caninum* cultivados *in vitro*.

Desses 11 animais, sete foram utilizados para esta pesquisa juntamente com os filhos procedentes da 2^a, 3^a, 4^a e 5^a gestações (tabela 1). Um macho da mesma raça ficou constantemente junto com as fêmeas.

Os animais foram identificados usando uma placa numerada na orelha e as crias nascidas com o mesmo número da mãe, precedido pela letra F com um número em subscrito indicando qual gestação. Por exemplo:

F₄9 (filhote da 4ª gestação da ovelha 9). Em casos de gestações de gêmeos os filhotes foram identificados com uma numeração adicional após a identificação convencional (F₃3-1, F₃3-2 – filhotes 1 e 2 da terceira gestação da ovelha 3).

Todos os animais ficaram instalados em um boxe revestido de cimento localizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HOV/DVT/UFV), isolados de outros animais, sendo alimentados com capim picado, ração com 20% de proteína e água *ad libitum*.

Tabela 1 - Identificação das ovelhas e estágio reprodutivo no momento da inoculação com *N. caninum* em 2001 e seus filhotes

Identificação dos animais	Estágio Reprodutivo	Filhotes da 1ª gestação	Filhotes da 2ª gestação	Filhotes de 3ª gestação	Filhotes da 4ª gestação	Filhotes da 5ª gestação
1*	10 DAP	F ₁ 1	F ₂ 1-1*/ F ₂ 1-2*/ F ₂ 1-3*	F ₃ 1-1*/ F ₃ 1-2	F ₄ 1*	-
2*	30 DG	F ₁ 2	F ₂ 2*	F ₃ 2*	F ₄ 2*	-
3*	10 DAP	F ₁ 3	F ₂ 3	F ₃ 3-1*/ F ₃ 3-2*	F ₄ 3-1*/ F ₄ 3-2*	-
4	90 DG	F ₁ 4	-	-	-	-
5	15 DG	F ₁ 5	-	-	-	-
6	AM	F ₁ 6	-	-	-	-
7*	AM	- ^a	F ₂ 7	F ₃ 7*	F ₄ 7*	-
8*	AM	F ₁ 8	F ₂ 8*	F ₃ 8-1*/ F ₃ 8-2*	F ₄ 8-1*/ F ₄ 8-2*	-
9*	30 DG	F ₁ 9	F ₂ 9*	F ₃ 9*	F ₄ 9*	-
10*	10 DAP	F ₁ 10	F ₂ 10*	F ₃ 10*	F ₄ 10*	F ₅ 10*
11	90 DG	F ₁ 11	-	-	-	-
12*	Controle neg.	F ₁ 12	-	-	-	-

DAP – dias após parto
 AM – antes da monta
 DG – dias de gestação
 * - ovelhas e crias usadas neste experimento
^a – reabsorção fetal

4.3 Amostra do Agente

As ovelhas foram infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum*, da amostra denominada NC-Beef, gentilmente cedida pelo professor Milton McAllister, da Universidade de Illinois – USA, atualmente sendo mantida em cultura “in vitro” no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) – BIOAGRO/DVT/UFV.

4.4 Coleta de Amostras

Seis ovelhas adultas (1, 2, 3, 7, 8 e 9) e seus respectivos filhotes de segunda, terceira e quarta gestações foram eutanasiados e necropsiados em diferentes idades, sendo dois filhotes natimortos, seis filhotes com idade acima de cinco meses, sete filhotes abaixo de cinco meses e oito fetos pertencentes à quarta geração. Destes fetos, dois estavam no terço inicial da gestação, três no terço médio e três no terço final (tabela 2). Ao se constatar que a ovelha adulta estava na sua quarta gestação, esta foi eutanasiada para a coleta de amostras do feto.

Foram feitas coletas de amostras dos seguintes tecidos: cérebro, medula, pulmão, fígado, placenta, coração e músculo esquelético da língua.

Uma ovelha adulta (ovelha 10) e seus filhotes de quarta e quinta gestações, além de uma ovelha de segunda gestação (F₂1-3) foram mantidos vivos.

Tabela 2 - Sexo e idade das crias no momento da necropsia

Animais	Sexo	Idade após nascimento	Tempo de gestação
F ₂ 1-1	Fêmea	natimorto	xxxx
F ₂ 1-2	Fêmea	natimorto	xxxx
F ₂ 2	Fêmea	5 meses	xxxx
F ₂ 8	Macho	2 meses	xxxx
F ₂ 9	Fêmea	3 anos	xxxx
F ₂ 10	Fêmea	1 ano	xxxx
F ₃ 1-1	Macho	10 meses	xxxx
F ₃ 2	Fêmea	10 meses	xxxx
F ₃ 3-1	Macho	4 dias	xxxx
F ₃ 3-2	Macho	4 dias	xxxx
F ₃ 7	Fêmea	3 dias	xxxx
F ₃ 8-1	Fêmea	9 dias	xxxx
F ₃ 8-2	Fêmea	9 dias	xxxx
F ₃ 9	Macho	5 meses	xxxx
F ₃ 10	Macho	3 meses	xxxx
F ₄ 1	- ^a	xxxx	Terço inicial gestação
F ₄ 2	Macho	xxxx	Terço final gestação
F ₄ 3-1	- ^a	xxxx	Terço médio gestação
F ₄ 3-2	- ^a	xxxx	Terço médio gestação
F ₄ 7	- ^a	xxxx	Terço inicial gestação
F ₄ 8-1	- ^a	xxxx	Terço final gestação
F ₄ 8-2	- ^a	xxxx	Terço final gestação
F ₄ 9	- ^a	xxxx	Terço médio gestação

^a – Dados perdidos

4.5 Preparação dos Cortes Histopatológicos

Após a fixação em formol 10% neutro tamponado, as amostras de tecido foram preparadas conforme procedimentos histológicos de rotina indicados por LUNA (1968), que consistem basicamente em desidratação, inclusão em parafina, cortes de 5 mm de espessura e coloração pela hematoxilina eosina (HE).

4.6 Imunohistoquímica

Para detectar cistos teciduais, amostras de cérebro de todos os cordeiros e fetos foram coradas usando o método imunohistoquímico PAP (peroxidase anti-peroxidase).

Secções de tecido previamente fixadas em solução neutra tamponada de formol 10% e incluídas em parafina foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em álcool, tratadas com peróxido de hidrogênio para inibir a atividade da peroxidase endógena e tripsina 1mg/ml para desmascarar antígenos.

Posteriormente procedeu-se a aplicação de soro normal de cabra para bloquear sítios inespecíficos, seguido de anticorpo primário específico (IgG de coelho anti - *Neospora caninum* produzido no LBCHV/BIOAGRO/DVT/UFV) com diluição 1:50, e anticorpo secundário (IgG de cabra anti-coelho) na diluição 1:10. Os cortes foram então cobertos com o complexo PAP (peroxidase anti-peroxidase) 1:200, produzido em coelho (SIGMA[®]). Aplicou-se a solução reveladora DAB (diaminobenzidina) com peróxido de hidrogênio. Após este procedimento, foi realizada a desidratação e coloração de contraste com hematoxilina diluída em água destilada 1:9, montagem da lâmina e visualização do tecido no microscópio óptico comum.

4.7 Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*

Durante o período de 2001 a 2004 foi coletado o soro de 21 animais, sendo sete provenientes das ovelhas adultas e 14 dos filhotes nascidos vivos.

Para detecção de IgG anti-*N. caninum*, foram utilizadas lâminas de vidro sensibilizadas com taquizoítos purificados no LBCHV. O ponto de corte para o soro foi a diluição de 1:50 em PBS-FA sendo que em cada lâmina foram incluídos controles positivo e negativo. Foi utilizado 15 µl de soro diluído 1:50 em PBS-FA, sendo incubados durante 40 minutos a 37° e posteriormente fizeram-se duas lavagens com PBS-FA de cinco minutos

cada. Após secagem à temperatura ambiente, adicionou-se 15 µl de IgG de coelho anti-ovelha conjugada com isotiocianato de fluoresceína 1:600, produzida no LBCH, BIOAGRO. Novamente foram feitas duas lavagens em PBS-FA sobre leve agitação, cinco minutos cada, e se procedeu à montagem da lamínula utilizando anti-fade, com o objetivo de evitar a perda de fluorescência.

5. RESULTADOS

De um total de 23 filhotes coletados, 12 cordeiros nasceram clinicamente saudáveis, dois cordeiros provenientes da segunda gestação (F₂1-1 e F₂1-2) nasceram mortos e um filhote veio a óbito com dois dias de vida (F₃7). Os oito fetos coletados também se apresentavam saudáveis. Um caso de abortamento (feto da ovelha F₂9) foi constatado, o qual não foi possível coletar material para histopatologia devido ao avançado estado de autólise em que se encontrava o feto. Outro filhote da ovelha F₂9 morreu com dois dias de vida, com crises convulsivas (o material também não pôde ser coletado).

5.1 Histopatologia

A ovelha 1 não apresentou lesões em nenhum tecido, porém em suas crias natimortas (F₂1-1 e F₂1-2), provenientes da segunda gestação, observaram-se grande hiperemia no coração, fígado e cérebro. Neste último órgão ainda foram encontrados pequenos focos de necrose e infiltrado inflamatório perivascular discreto (figura 2A). Na língua do filhote F₂1-1 observou-se um pequeno infiltrado inflamatório do tipo mononuclear, e no filhote F₂1-2 pôde-se notar também a presença de hemorragia no coração,

além de necrose não-supurativa acompanhada de hepatite multifocal (figura 2B).

O filhote da terceira gestação desta ovelha (F₃1-1) apresentou grande hiperemia no fígado e no pulmão e a formação de centros germinativos nos folículos linfóides peribronquiais (figura 3C). Não foi constatada a presença de lesões no sistema nervoso central. Em relação ao filhote da quarta gestação, não foram observadas lesões em nenhum dos tecidos analisados.

O único achado na ovelha 2, a qual foi inoculada em 2001, foi hiperemia nos pulmões. O filhote da sua segunda gestação (F₂2) apresentou no fígado hepatite periportal e perivascular discreta (figura 2C), além de miosite com infiltrado inflamatório subepitelial na língua. Já no cérebro, foram observadas manguito perivascular e hemorragia perivascular discretas. O cordeiro da terceira gestação (F₃2) apresentou intenso infiltrado inflamatório perivascular no pulmão, além de hiperemia nesse órgão e no fígado. O único achado observado no feto da quarta gestação (F₄2) foi pequenos focos de necrose de Zenker na língua (figura 4A).

A ovelha 3 também apresentava intensa hiperemia nos pulmões, além de um pequeno infiltrado inflamatório na língua. Um de seus filhotes da terceira gestação (F₃3-1) apresentava hiperemia no fígado, além da formação de centros germinativos no pulmão. No cérebro foi encontrado apenas um pequeno infiltrado inflamatório (figura 3A). Não foram constatadas alterações histopatológicas nos outros órgãos. O outro filhote (F₃3-2) apresentava grande infiltrado inflamatório no pulmão, além de uma meningoencefalite não-supurativa no cérebro (figura 3B). Os fetos da quarta gestação não apresentaram alterações nos tecidos analisados.

Em relação à ovelha 7, foi constatada a presença de cistos teciduais na língua, sem a presença de células inflamatórias no local. O cérebro, pulmão e fígado apresentavam-se hiperêmicos. O pulmão e o fígado, ainda, apresentavam infiltrados inflamatórios perivasculares do tipo mononuclear. Seu filhote da terceira gestação (F₃7) teve como única alteração, intensa hiperemia no fígado. O feto da quarta gestação (F₄7) apresentou focos de necrose e pequena hemorragia no pulmão (figura 4B), não sendo observado outras alterações nos demais órgãos.

Na ovelha 8 a única alteração observada foi a formação de um granuloma no fígado, enquanto seu filhote da segunda gestação (F₂8) apresentou unicamente hepatite perivascular. Um cordeiro da terceira gestação (F₃8-1) apresentou discreta hepatite focal. O pulmão encontrava-se bastante hiperêmico e hemorrágico. O feto da quarta gestação (F₄8-1) não apresentou lesões histológicas nos tecidos os quais foram estudados.

Na ovelha 9 foram observados infiltrados inflamatórios do tipo mononuclear no pulmão e hepatite perivascular. Cistos teciduais foram encontrados no coração, sem, no entanto, apresentar reação inflamatória. A ovelha da segunda gestação (F₂9) apresentava infiltrados inflamatórios multifocais no fígado e intensa hiperemia e hemorragia nos pulmões (figura 2D), não sendo observadas lesões nos demais tecidos analisados. No fígado do filhote da terceira gestação (F₃9) foi constatado discreto infiltrado inflamatório, enquanto que no pulmão houve formação de centro germinativo nos folículos linfóides peribronquiais e infiltrado inflamatório próximo aos bronquíolos. O filhote da quarta gestação não apresentou nenhuma alteração nos tecidos analisados.

Hepatite perivascular foi encontrada no filhote da segunda gestação da ovelha 10 (F₂10). O pulmão encontrava-se hiperêmico, com infiltrado inflamatório mononuclear intenso. O filhote da terceira gestação (F₃10) apresentou intensa hiperemia e focos inflamatórios nos pulmões, não sendo constatado outras alterações nos demais tecidos analisados.

Tabela 3 - Principais alterações histopatológicas encontrados em ovelhas inoculadas com *Neospora caninum* e suas respectivas crias de três gestações consecutivas

Alterações/ Tecido	Ovelhas Inoculadas	Segunda Gestação	Terceira Gestação	Quarta Gestação
SNC				
Encefalite multifocal	-	2(6) ^a	1(9)	- ^b
Necrose	-	1(6)	-	-
Hemorragia	-	1(6)	-	-
Meningite	-	-	1(9)	-
Fígado				
Hepatite periportal e/ou perivascular	2(7)	3(6)	-	-
Hepatite focal	-	1(6)	2(9)	-
Pulmão				
Pneumonia intersticial	2(7)	1(6)	6(9)	-
Necrose	-	-	-	1(8)
Hemorragia	-	1(6)	1(9)	1(8)
Coração				
Hemorragia	-	1(6)	-	-
Músculo Esquelético da Língua				
Glossite	1(7)	2(6)	-	-
Necrose	-	-	-	1(8)

^a : número de crias com alterações histopatológicas (total de crias da respectiva gestação)

^b : o sinal negativo refere-se à ausência de alterações histopatológicas

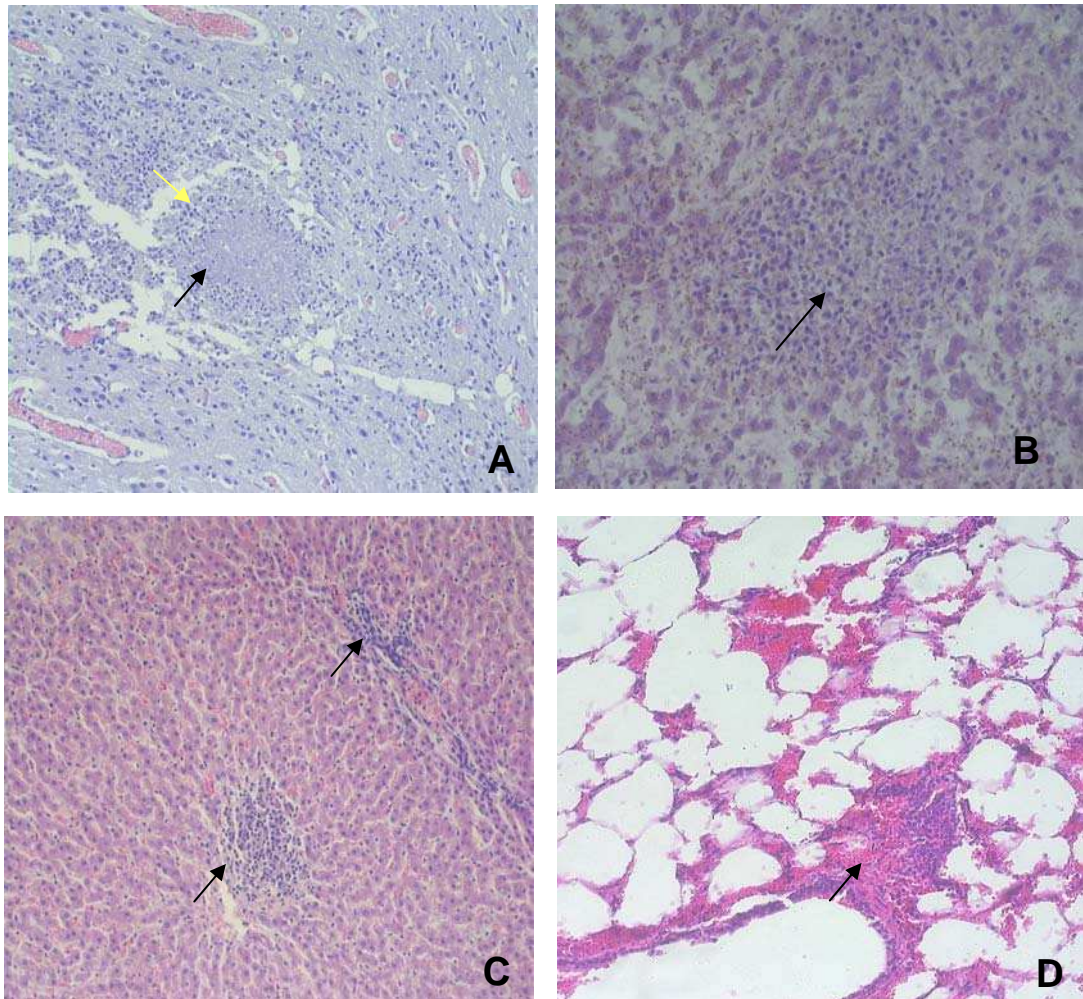


Figura 2. Lesões observadas em diferentes tecidos dos filhotes provenientes da segunda gestação. **A.** Foco de necrose (seta preta) rodeado de infiltrado inflamatório mononuclear (seta amarela) no cérebro, cordeiro F₂1-2, HE, 200X. **B.** Necrose não-supurativa acompanhada de hepatite focal (seta), cordeiro F₂1-2, HE, 400X. **C.** Hepatite perivascular discreta (setas), cordeiro F₂2, HE, 200X. **D.** Infiltrado inflamatório mononuclear e hiperemia intersticial pulmonar (seta), cordeiro F₂9, HE, 200X.

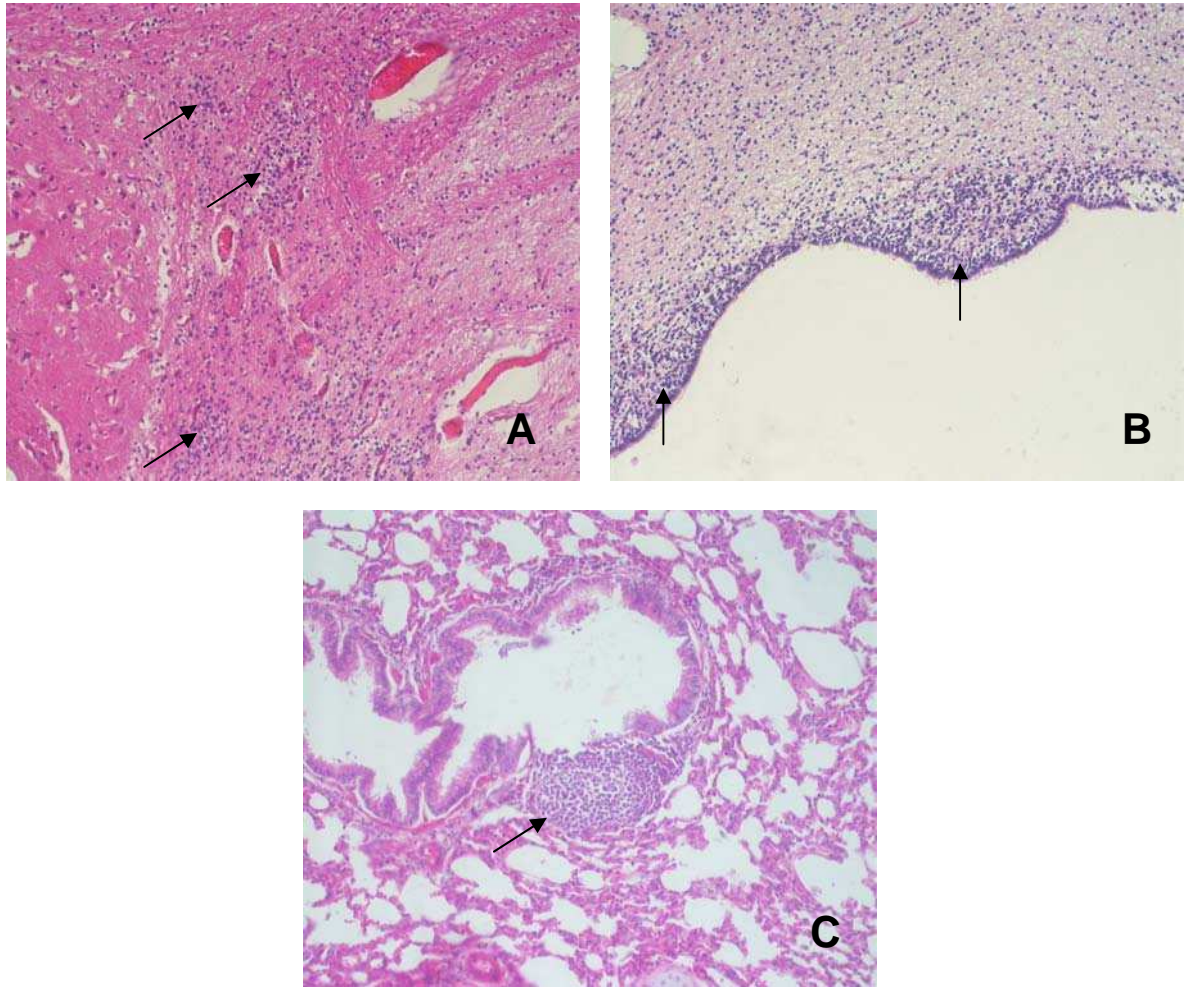


Figura 3. Lesões observadas em diferentes tecidos dos filhotes provenientes da terceira gestação. **A.** Infiltrado inflamatório mononuclear no cérebro (setas), cordeiro F₃₃-1, HE, 200X. **B.** Meningoencefalite subependimária não-supurativa (setas), cordeiro F₃₃-2, HE, 200X. **C.** Formação de centros germinativos nos folículos linfóides peribronquiais (seta), cordeiro F₃₁-1, HE, 200X.

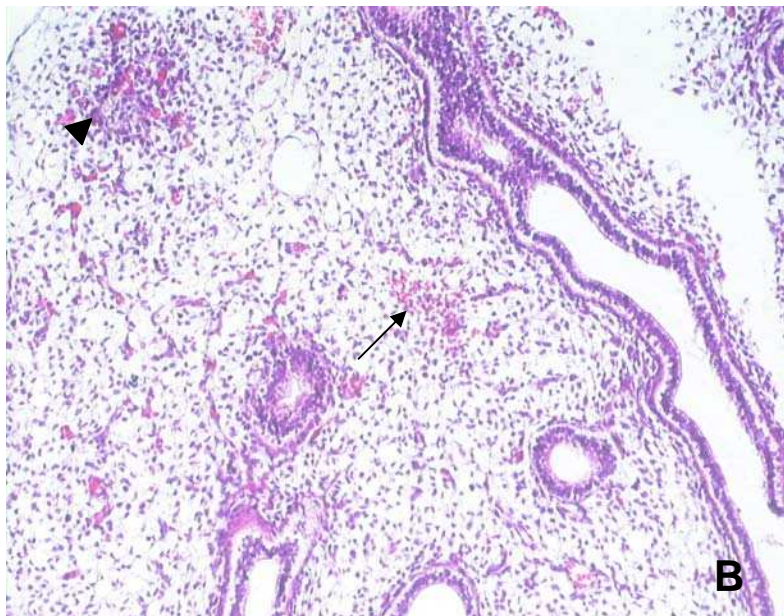
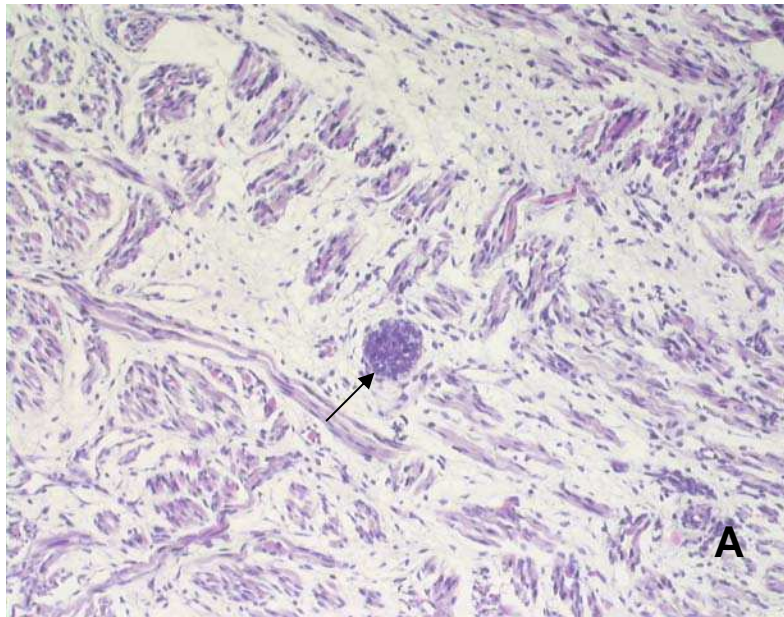


Figura 4. Lesões observadas em diferentes tecidos dos fetos provenientes da quarta gestação. **A.** Foco de necrose de Zenker na língua (seta), feto F₄₂, HE, 200X. **B.** Foco de necrose (cabeça de seta) e pequena hemorragia (seta) no pulmão, feto F₄₇, HE, 200X.

5.2 Imunohistoquímica

De todas as amostras de cérebro, medula e placenta coletadas para imunohistoquímica pelo método de peroxidase anti-peroxidase (PAP), apenas foi observado cisto no cérebro da ovelha 8 (figura 5A).

Pelo fato de terem sido encontrados cistos no coração e língua de duas ovelhas (ovelhas 7 e 9), foi realizado a técnica de PAP dos mesmos para verificar se eram realmente cistos teciduais de *N. caninum*, o que foi confirmado (figura 5B).

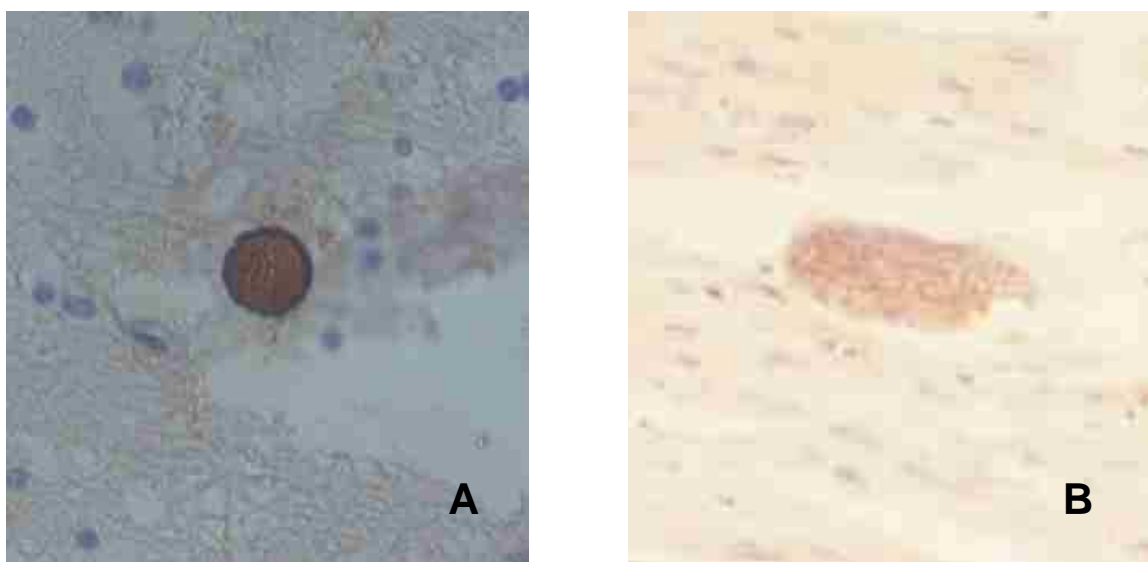


Figura 5. Cistos teciduais encontrados em ovelhas inoculadas, corados pelo método PAP. **A.** Cérebro da ovelha 8, 400X. **B.** Coração da ovelha 9, 400X.

5.3 Imunofluorescência para detecção de Anticorpos anti-*N. caninum*

Todas as amostras de soro coletadas dos filhotes da segunda e terceira gestações, além de dois filhotes mantidos vivos da quarta e quinta gestações (F₄10 e F₅10), se mostraram positivas para o parasita (Figura 6A e 6B).

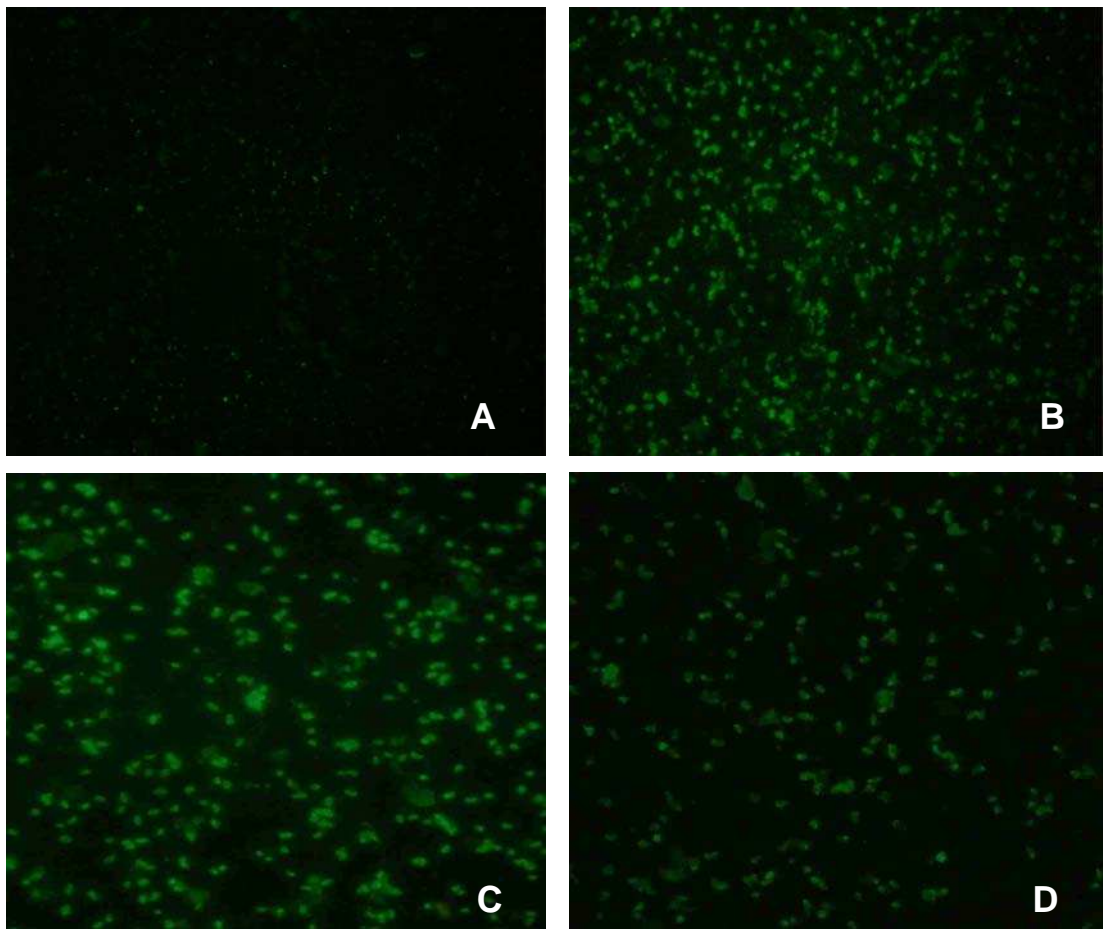


Figura 6. Reação de imunofluorescência indireta para *N. caninum*. **A.** Controle negativo. **B.** Controle positivo. **C e D.** Reações positivas dos filhotes F₂₁₋₃ (**C**), e F₅₁₀ (**D**), 400X.

6. DISCUSSÃO

Segundo vários autores (DUBEY & LINDSAY, 1996; McALLISTER *et al.*, 1996; BUXTON *et al.*, 1998), o abortamento é uma manifestação freqüente da neosporose nos hospedeiros intermediários, tendo sido também relatado numa segunda gestação (JOLLEY *et al.*, 1999). Entretanto, em um estudo com ovelhas deslanadas (raças Santa Inês e Morada Nova), infectadas experimentalmente através da via intravenosa, com *Neospora caninum* (amostra Nc-Beef), as quais foram observadas durante 32 semanas, não foram observados casos de abortamento; apesar disso, foram relatados casos de fetos mumificados, natimortos, mortalidade embrionária e nascimento de um cordeiro clinicamente fraco, sendo constatado lesões típicas de neosporose nos mesmos (OVIEDO, 2001). Em continuação a este estudo, no presente trabalho, foi constatado tal fato em uma ovelha proveniente da segunda gestação (F₂9) que abortou um feto (F₁F₂9), já em estado avançado de autólise.

Em bovinos, DUBEY & LINDSAY (1996) relatam número reduzido de casos de abortamentos em várias gestações em condições naturais. Semelhante ao que foi relatado por estes autores, em cinco gestações observadas no presente trabalho, também se constatou que o abortamento não é um fato comum em rebanhos fechados de ovinos deslanados, talvez

pelo fato de que, em condições experimentais, as ovelhas não sofreram reinfecções ao contrário do que acontece em casos a campo, onde pode ocorrer infecção persistente do agente.

O nascimento de dois natimortos na segunda gestação e de outras crias clinicamente normais, também foi relatado por JOLLEY *et al.* (1999) em ovelhas de lã da raça Rambouillet. Igualmente, casos de natimortos já foram relatados por OVIEDO (2001), porém durante a primeira gestação. Estas ocorrências podem ser explicadas pela imunomodulação que acontece durante a gestação, devido à ovelha gestante tornar-se susceptível à recrudescência da infecção. Se este fato ocorre durante a metade da gestação o parasita infecta o feto, o qual já pode responder à agressão causada, embora de forma ineficiente, podendo levar ao abortamento, à natimortalidade, ou então ao nascimento de um cordeiro fraco. Entretanto, quando essa recrudescência ocorre no final da gestação o feto já pode enfrentar a infecção de forma eficiente, nascendo clinicamente normal, porém infectado (INNES *et al.*, 2002, WILLIAMS, *et al.*, 2003).

Neste trabalho, as lesões das gestações subseqüentes (3ª e 4ª gestações) foram analisadas, e foi constatado que a ovelha adulta gestante, apesar de infectada, pôde controlar a infecção, impedindo que o parasita causasse grandes danos aos fetos. Apesar de seu desenvolvimento normal, tanto as crias nascidas vivas quanto os fetos necropsiados apresentavam lesões nos tecidos analisados, sendo estas mais comuns nas crias da terceira gestação.

A prévia inoculação das ovelhas com *N. caninum* pode desencadear uma resposta imune capaz de controlar a disseminação do parasita, devido a um equilíbrio na produção de citocinas do tipo Th1/Th2 (NISHIKAWA *et al.*, 2003), o que talvez explique o nascimento de cordeiros clinicamente normais. Nesta pesquisa, de quinze animais, doze nasceram clinicamente normais. De acordo com ANDERSON *et al.* (2000) e BUXTON *et al.* (2002) também é incomum o nascimento de bezerros infectados que exibem anormalidades no sistema nervoso.

Até a presente data as alterações histopatológicas são relatadas nos hospedeiros intermediários infectados natural ou experimentalmente, além de suas crias da primeira e segunda gestações (DUBEY & LINDSAY, 1996;

McALLISTER *et al.*, 1996; BUXTON *et al.*, 1998; JOLLEY *et al.*, 1999; OVIEDO, 2001). Os resultados aqui apresentados demonstram que tais alterações também podem ser encontradas nos filhotes das gestações subseqüentes, apesar de suas mães terem apenas um único contato com o protozoário.

As lesões causadas em bovinos, ovinos e caprinos devido à neosporose, localizam-se preferencialmente no sistema nervoso central, coração, fígado e músculo esquelético (DUBEY & LINDSAY, 1996; OVIEDO, 2001; MOORE *et al.*, 2005), e são caracterizadas como necróticas e inflamatórias. Focos de necrose acompanhados de encefalite não-supurativa foram observados neste trabalho somente em alguns filhotes da segunda gestação, apesar de serem os principais achados histopatológicos em ruminantes (DUBEY & LINDSAY, 1996; OVIEDO, 2001; DUBEY, 2003; MOORE *et al.*, 2005). Estes autores também afirmam que é comum encontrar lesões na medula espinhal; porém as alterações observadas nas ovelhas não eram muito evidentes. Além disso, não foram encontradas lesões necróticas e/ou inflamatórias no músculo cardíaco, apesar dos mesmos estarem infectados.

No fígado, a presença de infiltrado inflamatório caracterizando uma hepatite perivascular e periportal além de focos de necrose tanto nos filhotes como nas ovelhas adultas é um achado que está de acordo com relatos em várias espécies animais (DUBEY & LINDSAY, 1996; OVIEDO, 2001; DUBEY, 2003; MOORE *et al.*, 2005).

Outro achado histopatológico freqüente é a pneumonia intersticial (DUBEY & LINDSAY, 1996; ANDERSON *et al.*, 2000), a qual foi constatada no presente trabalho acompanhada de intensa hiperemia nas ovelhas inoculadas e em filhotes de segunda e terceira gestações.

Na língua e coração, foi encontrado infiltrado inflamatório, apenas nas ovelhas que foram inoculadas e nos filhotes da segunda gestação, enquanto foi observada necrose de Zenker na língua de um feto da quarta gestação. Em duas ovelhas que tinham sido inoculadas em 2001 (ovelhas 7 e 9) e sacrificadas em 2003, foram encontradas na língua (ovelha 7) e no coração (ovelha 9) as formas císticas do parasita, fato este até então não relatado na literatura.

No presente estudo não foram encontradas lesões relacionadas ao placentoma. Porém, pesquisas afirmam que se podem encontrar lesões no placentoma caracterizadas por placentite e focos de necrose (DUBEY & LINDSAY, 1996; MACALDOWIE *et al.*, 2003; MALEY *et al.*, 2003).

Os cistos teciduais que foram observados no cérebro, coração e língua de três ovelhas previamente infectadas neste estudo, apesar de não apresentarem qualquer reação inflamatória, foram confirmados através do uso de anticorpos monoespecíficos e policlonais (IgG) contra *N. caninum*, sendo que diversos autores descrevem tais cistos comumente no cérebro e na medula espinhal (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 2002) e no tecido muscular esquelético (PETERS *et al.*, 2001); porém, no presente estudo não foram encontrados cistos na medula espinhal de nenhum ovino inoculado e em nenhuma de suas crias estudadas. Segundo SPEER *et al.* (1999), em animais naturalmente infectados, cistos teciduais de *N. caninum* são muito difíceis de serem encontrados.

As alterações histopatológicas observadas após dois anos da inoculação nas ovelhas adultas eram poucas, não sendo consideradas muito significativas, porém, as crias apresentavam lesões que eram compatíveis com um quadro de neosporose (tabela 3), apesar de estas apresentarem-se clinicamente normais. Este quadro está de acordo com o relatado por DUBEY & LINDSAY (1996), JOLLEY *et al.* (1999) e OVIEDO (2001), os quais afirmam que lesões histopatológicas são encontradas principalmente nos filhotes. Além disso, os animais que foram mantidos vivos, até a presente data não apresentaram nenhum sinal clínico da neosporose, apesar de todos estarem positivos para a infecção.

A imunofluorescência foi um método diagnóstico complementar bastante eficiente para se confirmar a infecção dos ovinos com *N. caninum*, pois em alguns destes animais não foram encontradas lesões típicas de neosporose, apesar de se confirmarem positivos à infecção através desta técnica. De fato, a imunofluorescência indireta é uma técnica muito utilizada para a detecção de animais infectados com *N. caninum*, sendo considerada como o “padrão ouro” (gold standard) dos diagnósticos sorológicos de neosporose (DUBEY & LINDSAY, 1996; REICHEL & PFEIFFER, 2002).

Estes resultados apresentados demonstram que apesar de nascerem clinicamente normais, os filhotes de várias gestações, posteriores às infecções naturais ou experimentais, podem adquirir o parasita pela via transplacentária, sendo uma forma comum de permanência do mesmo no rebanho, concordando com o que foi relatado por BUXTON *et al.*, (2001) ao trabalhar com ovelhas da raça Scottish Blackface. Outra hipótese que poderia explicar a permanência do parasita seria devido ao ato da placentofagia, o que é muito comum em caprinos e ovinos, ocasionando a re-infecção destes animais.

O fato de se encontrar crias sorologicamente positivas e clinicamente normais após cinco gestações consecutivas é indicativo de que houve recrudescência da infecção. Este resultado é confirmado pelas observações de WILLIAMS *et al.* (2003), a qual relata que se a infecção ocorrer durante o terço final da gestação o feto pode sobreviver e nascer infectado. Ainda, estes mesmos autores afirmam que o sistema imune da fêmea infectada é ativado prontamente no início da gestação, reduzindo o risco de ativação de uma infecção latente, e leva à proteção do feto. Uma vez que o feto desenvolve o seu sistema imune, ele pode controlar a infecção que é ativada durante a gestação. E embora durante a gestação ocorra modulação da resposta imune adaptativa de um perfil Th1 para um perfil Th2 que favorece o crescimento do feto, ela também leva à recrudescência da infecção. Apesar disto, especula-se que elementos da imunidade inata são ativados para controlar a infecção, compensando o perfil Th2 da fêmea gestante, ao mesmo tempo em que protege o desenvolvimento fetal.

7. CONCLUSÕES

1. Mesmo após cinco gestações, ovinos infectados com *Neospora caninum* são capazes de transmitir a infecção para os filhotes, podendo afirmar que a transmissão vertical é uma via eficaz de permanência do parasita no rebanho por muitas gerações.
2. O protozoário pode causar alterações histopatológicas no feto, de caráter predominantemente inflamatório no fígado, pulmão, cérebro e língua, apesar dos animais poderem ter somente um único contato com o mesmo.
3. Apesar de alterações microscópicas serem provocadas pelo parasita em várias gestações de filhotes infectados, estes podem não desenvolver um quadro clínico da doença, convivendo com a infecção, sem, no entanto, afetar o desenvolvimento dos mesmos.
4. Formas císticas de *Neospora caninum* podem ser encontradas no coração e na língua, além do sistema nervoso central.
5. Através do modelo experimental apresentado neste estudo da transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas deslanadas pode-se inferir que bovinos infectados podem transmitir o parasita nas subseqüentes gestações, sem, no entanto, causar abortamento.
6. Por ser a criação de ovinos deslanados uma atividade importante no Brasil, é imprescindível fazer um levantamento epidemiológico da neosporose nestes animais para se estabelecer métodos de controle, a fim de evitar perdas econômicas devido à permanência da infecção no rebanho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.A.O., 2004. **Epidemiologia de *Neospora caninum***. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, 38 – 40.
- ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S., 2002. **Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediated host of *Neospora caninum***. Vet. Parasitol. 107, 287 – 294.
- ANDERSON, M.L. ; ANDRIANARIVO, A.G. ; CONRAD, P.A., 2000. **Neosporosis in cattle**. An. Reprod. Sci. 60, 417 – 431.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J., 1998. **Naturally occurring vertical Transmission of *Neospora caninum* in dog**. Int. J. Parasitol. 28, 57 – 64.
- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; DAFT, B.M.; KINDE, H.; CONRAD, P.A., 1990. **Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections**. Vet. Pathol. 27, 354 – 361.
- BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.W.; TARANTAL, A.F.; HENDRICKX, A.G., 1994. **Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate**. Lab. Invest. 71, 236 – 242.
- BARTLEY, P.M.; KIRVAR; E.; WRIGHT, S.; SWALES, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; MALEY, S.W.; SCHOCK, A.; RAE, A. G.; HAMILTON C.; INNES, E. A., 2004. **Maternal and Fetal Immune Responses of Cattle Inoculated with *Neospora caninum* at Mid-Gestation**. J. Comp. Path. 130, 81 – 91.

- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; MOORE, D.P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J.M.; CAMPERO, C.M.; BACIGALUPE, D.; DUBEY, J.P., 2001. **Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms and from urban areas of Argentina.** J. Parasitol. 87, 906–907.
- BERGERON, N.; FECTEAU, G.; VILLENEUVE, A.; GIRARD, C.; PARÉ, J., 2001. **Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*.** Vet. Parasitol. 97, 145 – 152.
- BJERKAS, I.; DUBEY, J.P., 1991. **Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs.** Acta Vet. Scand. 32, 407 – 410.
- BOGER, L. A.; HATTEL, A. L., 2003. **Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis.** Vet. Parasitol. 113, 1 – 6.
- BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; THOMSON, K.M.; RAE, A.G.; INNES, E.A., 1998. **The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep.** J. Comp. Pathol. 118, 267 – 279.
- BUXTON, D.; WRIGHT, S.; MALEY, S.W.; RAE, A.G.; LUNDÉN, A.; INNES, E.A., 2001. **Immunity experimental neosporosis in pregnant sheep.** Par. Immunol. 23, 85 – 91.
- BUXTON, D.; McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P., 2002. **The comparative pathogenesis of Neosporosis.** Trends in Parasitology v.18, n.12, 546 – 552.
- CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M., 2004. **Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls.** Theriogenology 62, 1329 – 1336.
- CAETANO-DA-SILVA, A.C., 2004. **Diagnóstico da neosporose bovina.** Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, 29 – 33.
- CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; CARVALHEIRA, J.; ROCHA, A.; SOUSA, S.; CORREIA DA COSTA; J.M., 2004. **Determination of an optimized cut-off value for the *Neospora* agglutination test for serodiagnosis in cattle.** Vet. Parasitol. 121, 225 – 231.
- CAÑÓN-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M., 2003. **Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon. Brazil.** Vet. Parasitol. 115, 71–74.

- COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P., 1995a. **Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice.** J. Parasitol. 81, 730 – 732.
- COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SORJONEN, D.C.; DUBEY, J.P., 1995b. **Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs.** J. Parasitol. 81, 208 – 211.
- CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V., 2002. **Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil.** Vet. Parasitol. 103, 195–202.
- DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J., 1999. **Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle.** Int. J. Parasitol. 29, 1683 – 1689.
- DELCAMPO, J.S.; CHÁVEZ, A.V., DELGADO, A.C.; FALCÓN, N.P.; ORNELAS, Â.A.; CASAS, E.A.; SERRANO, E.M., 2003. **Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del Valle de Lima.** Rev. Inv. Vet. 14, 145 – 149.
- DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; GASBARRE, L., 1999. **Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses.** Int. J. Parasitol. 29, 1647 – 1657.
- DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W., 2001. **Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites.** Int. J. Parasitol. 31, 747 – 752.
- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J.W.; WOUDA, W., 2002a. **Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle.** Vet. Parasitol. 105, 99 – 104.
- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J.W.; WOUDA, W., 2002b. **Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog.** Vet. Parasitol. 105, 89 – 98.
- DUBEY, J.P., 1989. **Congenital Neosporosis in a calf.** Veterinary Record 125, 486.
- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J., 1988. **Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission.** J. Am. Vet. Med. Ass. 193, 1259 – 1263.

- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S., 1996. **A review of *Neospora caninum* and neosporosis**. Vet. Parasitol. 67, 1 – 59.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S., 2000. **High susceptibility of gerbils to oral infection with *Neospora caninum* oocyst**. Parasitol. Res. 86, 165 – 168.
- DUBEY, J.P.; RIGOULET, J.; LAGOURETTE, P.; GEORGE, C.; LONGEART, L.; LE NET, J.L., 1996. **Fatal Transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*) from a zoo**. J. Parasitol. 82, 338 – 339.
- DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDELL, S.; SPEER, C.A.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K. , 1998a. **Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture**. Int. J. Parasitol. 28, 1293 – 1304.
- DUBEY, J.P.; ROMAND, S.; HILALI, M.; KWOK, O.C.H.; THULLIEZ, P., 1998b. **Seroprevalence of Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt**. Int. J. Parasitol. 28, 527 – 529.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, B.L.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S., 2002. **Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia**. Int. J. Parasitol. 32, 929 – 946.
- DUBEY, J.P.; PIMENTA, A.L.; ABOUD, L.C.S.; RAVASANI, R.R.; MENSE, M., 2003. **Dermatitis in a dog associated with an unidentified *Toxoplasma gondii*-like parasite**. Vet. Parasitol. 116, 51 – 59.
- FRENCH, N.P.; CLANCY, D.; DAVISON, H.C.; TREES, A.J., 1999. **Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control**. Int. J. Parasitol. 29, 1691 – 1704.
- GENNARI, S.M.; YAI, L.E.O.; D'ÁURIA, S.N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P., 2002. **Ocurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera of dogs of the city of São Paulo, Brazil**. Vet. Parasitol. 106, 177 – 179.
- GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; MONTEIRO JR., L.A.; HARITANI, M., 1999a. ***Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil**. N. Z. Vet. J. 47, 35.

- GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I., 1999b. **Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle in Bahia, Brazil.** Vet. Parasitol. 86, 71–75.
- GONDIM, L. F.P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E., 2004. **Coyotes (Canis latrans) are definitive hosts of Neospora caninum.** Int. J. Parasitol. 34, 159 – 161.
- GUIMARÃES Jr., J.S.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M.; 2004. **Prevalence of Neospora caninum antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil.** Vet. Parasitol. 124,1 – 8.
- HALL, C.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T., 2005. **Neospora abortions in Dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control.** Vet. Parasitol. 128, 231 – 241.
- HILALI, M.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.H.; DUBEY, J.P., 1998. **Prevalence of Neospora caninum and Toxoplasma gondii antibodies in sera from camels from Egypt.** Vet. Parasitol. 75, 269 – 271.
- HORNA, S.M.; CHÁVEZ, A.V.; CASAS, E.A.; SERRANO, E.M., 2003. **Seroprevalencia de Neospora caninum en caninos de dos Distritos de la provincia de Chachapoyas.** Rev. Inv. Vet. Perú, 14 (2): 150-154.
- INNES, E.A.; ANDRIANARIVO, A.G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.L.; CONRAD, P.A., 2002. **Immune responses to Neospora caninum and prospects for vaccination.** Trends in Parasitol. 18, 497 – 504.
- JARDINE, J.E., 1996. **The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of Neospora caninum in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin.** Vet. Parasitol. 62, 231 – 240.
- JENSEN, L.; JENSEN, T.K.; LIND, P.; HENRIKSEN, S.A.; UGGLA, A.; BILLE-HANSEN, V., 1998. **Experimental porcine neosporosis.** APMIS 106, p.i. 4, 475 – 482.
- JOLLEY, W.R.; McALLISTER, M.M.; McGUIRE, A.M.; WILLS, R.A., 1999. **Repetitive abortion in Neospora-infected ewes.** Vet. Parasitol. 82, 251 – 257.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W., 2000. **Patologia Veterinária.** 6ª ed. São Paulo. Editora Manole. 1416p.
- KASHIWAZAKI, Y.; GIANNEECHINI, R.E.; LUST, M.; GIL, J., 2004. **Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay.** Vet. Parasitol. 120, 139–144.

- KHAN, I.A.; SCHWARTZMAN, J.D.; FONSEKA, S.; KASPER, L.H., 1997. ***Neospora caninum*: Role for immune cytokines in host immunity.** Exp. Parasitol. 85, 24 – 34.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P., 1990a. **Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa).** J. Parasitol. 76, 410 – 413.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P., 1990b. ***Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) Infections in rats.** Can. J. Zool. 68, 1595 – 1599.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B., 1999. **Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*.** Vet. Parasitol. 82, 327 – 333.
- LINDSAY, D.S.; KELLY, E.J.; MCKOWN, R.; STEIN, F.J.; PLOZER, J.; HERMAN, J.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P., 1996. **Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in Coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*.** J. Parasitol. 82, 657 – 659.
- LINDSAY, D.S.; RIPPEY N.S.; YOWE, T.A.; SARTIN, E.A.; DUBEY, J.P.; BLAGBURN, B.L., 1995. **Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*.** Am. J. Vet. Res. 56, 1176 – 1180.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R.D., 2001. **Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in Southern Brazil.** J. Parasitol. 87, 1493–1494.
- LUNA, L.G., 1968. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.** 3rded. Washington D.C. McGraw – Hill, 1 – 37.
- MACALDOWIE, C.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E.A., 2004. **Placental Pathology Associated with Fetal Death in Cattle Inoculated with *Neospora caninum* by Two Different Routes in Early Pregnancy.** J. Comp. Pathol. 131, 142 – 156.
- MALEY, S.W.; BUXTON, D.; RAE, A.G.; WRIGHT, S.E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P.M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C.M.; SALES, J.; INNES, E.A., 2003. **The Pathogenesis of neosporosis in Pregnant Cattle: Inoculation at Mid-gestation.** J. Comp. Pathol. 129, 186 – 195.
- MARSH, A.E.; BARR, B.C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDLHAUSEN, R.; CONRAD, P.A., 1996. **Neosporosis as a cause of equine Protozoal Myeloencephalitis,** J. Am. Vet. Med. Ass. 209, 1907 – 1913.

- MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A., 1998. **Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae)**. J. Parasitol. 84, 983 – 991.
- McALLISTER, M.M. **Uncovering the Biology and Epidemiology of *Neospora caninum***. Parasitology Today, v.15, n.6 p.216 - 217, 1999.
- McALLISTER, M.M.; McGUIRE, A.M.; JOLLEY, W.R.; LINDSAY, D.S.; TREES, A.J.; STOBART, R.H., 1996. **Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring**. Vet. Pathol. 33, 647 – 655.
- McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRE, A.M., 1998. **Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum***. Int. J. Parasitol. 28, 1473 – 1478.
- MOORE, D.P., 2005. **Neosporosis in South America**. Vet. Parasitol. 127, 87 – 97.
- MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEÓN, A.C.; POSSO, M.A.; CANO, D.; LEUNDA, M.R.; BASSO, W.; VENTURINI, M.C.; SPÄTH, E., 2002. **Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina**. Vet. Parasitol. 107, 303 – 316.
- MOYA, R.F.; CHÁVEZ, A.V.; CASAS, E.A.; SERRANO, E.M.; FALCÓN, N.P.; PEZO, D. C., 2003. **Seroprevalencia de *Neospora caninum* en llamas de la Provincia de Melgar, Puno**. Rev Inv Vet Perú, 14, 155 – 160.
- MUGRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; HECKEROTH, A.R.; JOHNSON, A.M.; TENTER, A.M., 1999. **Phylogenetic 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***. Int. J. Parasitol. 29, 1545 – 1556.
- NISHIKAWA, Y.; INOUE, N. ; MAKALA, L. ; NAGASAWA, H, 2003. **A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection**. Vet. Parasitol. 116, 175 – 184.
- ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G., 2003. **Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls**. Vet. Parasitol. 117, 301 – 308.
- OSAWA, T.; WASTLING, J.; ACOSTA, L.; ORTELLADO, C.; IBARRA, J.; INNES, E.A., 2002. **Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay**. Vet. Parasitol. 110, 17–23.

- OVIEDO, T.S., 2001. **Infecção experimental de ovelhas deslanadas com *Neospora caninum***. Dissertação de Mestrado – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 70p.
- OVIEDO, T.S.; GORETTI, R.G.; VILÓRIA, M.I.V.; PATARROYO, J.H.S., 2003. **Histopatología de la infección experimental de ovejas sin lana *Ovis aries* por *Neospora caninum***. MVZ-Córdoba 8, 261 – 264.
- PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G., 2001. **Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle**. Int. J. Parasitol. 31, 1144 – 1148.
- QUINN, H.E.; ELLIS, J.T.; SMITH, N.C., 2002. ***Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy?** Trends in Parasitology 18, n.8, 391 – 394.
- RAGHUPATHY, R., 1997. **Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy**. Immunology Today 18, 178 – 182.
- RAJAB, M.H.; CARTWRIGHT, T.C.; DAHM, P.F.; FIGUEIREDO, E.A.P., 1992. **Performance of Three Tropical Hair Sheep Breeds**. J. Anim. Sci. 70, 3351 – 3359.
- REICHEL, M.P.; PFEIFFER, D.U., 2002. **An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle**. Vet. Parasitol. 107, 197 – 207.
- RINALDI, L.; FUSCO, G.; MUSELLA, V.; VENEZIANO, V.; GUARINO, A.; TADDEI, R.; CRINGOLI, G., 2005. ***Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems**. Vet. Parasitol. 128, 219 – 230.
- RIVERA, G.H.; NELSON, D.; TABACCHI, L.N., 2000. ***Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima**. Rev. Invest. Vet. Peru. 11, 1–7.
- ROBERTS, C.W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J., 2001. **Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites**. Clin. Microbiol. 14, n.3, 476 – 488.
- SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C.; MORITA, K.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T., 2000. **Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow**. Veterinary Parasitology. v.90, p.247 – 252.
- SIMPSON, V.R.; MONIES, R.J.; RILEY, P.; CROMEY, D.S., 1997. **Foxes and Neosporosis**. Veterinary Record. 141, 503.

- ŠLAPETA, J.R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOŘEJŠ, R.; LUKEŠ, J.; KOUDELA, B., 2002. **Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach.** *Vet. Parasitol.* 2432, 1 – 11.
- SMITH, N.C., 1996. **An immunological hypothesis to explain the enhanced susceptibility to malaria during pregnancy.** *Parasitol. Today* 12, n.1, 4 – 6.
- SPEER, C.A.; DUBEY, J.P.; McALLISTER, M.M.; BLIXT, J.A., 1999. **Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.** *Int. J. Parasitol.* 29, 1509 – 1519.
- STENLUND, S.; KINDAHL, H.; MAGNUSSON, U.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C., 1999. **Serum antibody profile and pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*.** *Vet. Parasitol.* 85, 227 – 234.
- THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P., 1989. **Neosporosis - Like Abortions in a Herd of Dairy Cattle.** *J. Vet. Diag. Inv.* 1, 205 – 209.
- TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M.; McALLISTER, M.M., 1999. **Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neospora caninum*.** *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 6, 765 – 767.
- TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A.; WASTLING, J.M., 1999. **Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis.** *Int. J. Parasitol.* 29, 195 – 1200.
- VITALIANO, S.N.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R., 2004. **Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil.** *Vet. Parasitol.* 122, 253–260.
- WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; SMITH, R.F.; GUY, F.; MCGARRY, J.W.; MCKAY, J.S.; TREES, A.J., 2003. **First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection.** *Int. J. Parasitol.* 33, 1059 – 1065.
- ZAMBRANO, J.L.V.; COTRINO, V.B.; JIMÉNEZ, C.E.; ROMERO, M.; GUERRERO, B., 2001. **Evaluación serológica de *Neospora caninum* en bovinos en Colombia.** *Acovez* 26, n.1.