



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO ANDRE FRIGOTTO

*Neospora caninum* EM VACAS LEITEIRAS E BEZERRAS DA  
**REGIÃO OESTE DO PARANÁ:**  
ASSOCIAÇÃO ENTRE SOROPOSITIVIDADE E HISTÓRICO DE  
ABORTO, E A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$  E  
IL-10

TIAGO ANDRE FRIGOTTO

***Neospora caninum* EM VACAS LEITEIRAS E BEZERRAS DA  
REGIÃO OESTE DO PARANÁ:  
ASSOCIAÇÃO ENTRE SOROPOSITIVIDADE E HISTÓRICO DE  
ABORTO, E A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$  E  
IL-10**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina  
2017

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

F912n Frigotto, Tiago Andre.

eospora caninum em vacas leiteiras e bezerras da região oeste do Paraná : associação entre soropositividade e histórico de aborto, e a expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 / Tiago Andre Frigotto. - Londrina, 2017.  
61 f.: il.

Orientador: João Luis Garcia.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Bovino de leite - Doenças - Paraná - Teses. 2. Neosporose - Teses. 3. Aborto nos animais - Teses. 4. Parasitologia veterinária - Teses. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.2(816.2)

TIAGO ANDRE FRIGOTTO

***Neospora caninum* EM VACAS LEITEIRAS E BEZERRAS DA REGIÃO  
OESTE DO PARANÁ:  
ASSOCIAÇÃO ENTRE SOROPOSITIVIDADE E HISTÓRICO DE ABORTO,  
E A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$  E IL-10**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador Prof. Dr. João Luis Garcia  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Odilon Vidotto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. José da Silva Guimarães Junior  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Alexey Leon Gomel Bogado  
Universidade Norte do Paraná - UEL

Londrina, 31 de agosto de 2017.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico à minha esposa Alice e ao nosso filho

Lorenzo.

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa Alice, pelo carinho, apoio, amizade, companheirismo e paciência nos momentos mais difíceis e nas ausências durante a realização das disciplinas e elaboração da tese. Não teria alcançado esse objetivo sem sua presença!

Ao meu filho Lorenzo, nascido durante o período de finalização desse trabalho, me fortalecendo e estimulando.

Agradeço ao meu orientador, Prof. João Luis, pela disponibilidade, oportunidade, confiança, compreensão, ajudas, conselhos que foram além dos relacionados ao nosso trabalho, pelas cobranças e chamadas de atenção, pelo exemplo de profissionalismo, sendo um verdadeiro mestre.

À Beatriz, pela direta e fundamental colaboração e ensinamentos, do início até o final da minha pesquisa e elaboração da tese.

Aos colegas da pós-graduação, especialmente os do laboratório de Protozoologia.

Aos professores da Ciência Animal, especialmente aos Doutores Odilon, Amauri e Roberta pelos conselhos no início e durante o trabalho.

À Helenice, pela atenção e disponibilidade.

Aos proprietários e funcionários das fazendas que fiz as coletas, pela receptividade, disponibilidade, oportunidade e confiança.

Ao meu ex-aluno e orientado, agora Médico Veterinário, Thiago Genz pela direta colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária (FA) pelo financiamento da pesquisa.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

À PUCPR por me permitir a realizar este objetivo.

Aos meus amigos Solian, Willian e Vinícius pela ajuda indireta.

A todos que de alguma forma me ajudaram.

FRIGOTTO, Tiago Andre. **Neospora caninum em vacas leiteiras e bezerras da região oeste do Paraná**: Associação entre soropositividade e histórico de aborto, e a expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10. 2017. 61 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

O protozoário *Neospora caninum* é considerado um dos principais agentes causadores de abortamentos em bovinos leiteiros, promovendo severos prejuízos econômicos à atividade. Há duas formas de transmissão, sendo a transplacentária a forma mais importante para a manutenção da infecção no rebanho. Durante a gestação de vacas infectadas, há resposta imune do hospedeiro frente ao parasita pela produção de citocinas inflamatórias, como o Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) e a Interleucina 10 (IL-10), no intuito de conter a infecção do *N. caninum* impedindo que ocorra o abortamento. Os objetivos deste trabalho foram, inicialmente, associar a presença de anticorpos contra *N. caninum* com histórico de abortamento em vacas leiteiras. Em seguida, objetivou-se avaliar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas leiteiras recém-paridas e em suas progênes; e a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e IL-10 na interface materno-fetal para caracterizar as respostas imunes que ocorrem em associação com infecção por *N. caninum* em vacas parturientes e em suas progênes. A sorologia foi realizada por meio da reação de imunofluorescência indireta (IFI) (sendo consideradas positivas quando os títulos foram maiores ou iguais a 1:100) e a expressão gênica das citocinas foi realizada pela qPCR (de células provindas da papa de leucócitos) e avaliada pelo método de Quantificação Relativa (QR). Em nove propriedades leiteiras que possuíam vacas com histórico de abortamento, avaliou-se um total de 46 vacas leiteiras, sendo 28 com histórico de um ou mais abortamentos e 18 sem histórico de abortamentos. A soro ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* entre todas as vacas avaliadas foi de 39,1% (18/46), entre as vacas com histórico de abortamento foi de 57,1% (16/28) e de 11,1% (2/18) nas vacas que não haviam abortado. Dentre as vacas soropositivas, 88,9% possuíam histórico de aborto. Todas as propriedades avaliadas apresentaram animais com anticorpos contra o *N. caninum*. Vacas soropositivas apresentaram 10,6 vezes mais chances de serem sororreagentes ao *Neospora caninum* do que vacas sem histórico de abortamento, concluindo-se que existe associação entre histórico de abortamento e presença de anticorpos contra *Neospora caninum*. Para a determinação da ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* e a expressão gênica das citocinas em vacas leiteiras e em bezerras sororreagentes, utilizou-se oito propriedades leiteiras de quatro municípios da região oeste do Paraná. Coletou-se amostras de sangue de vacas e das progênes no primeiro dia após o parto, totalizando 54 animais adultos e 55 bezerras (houve um parto gemelar). Nova colheita foi realizada nas bezerras aos seis meses de idade. A ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* nas vacas recém-paridas foi de 9,23% e das progênes ao nascimento foi de 23,2%. Aos seis meses de idade, 23% (3/13) das bezerras foram novamente sororreagentes. Nos oito rebanhos monitorados, 37,5% (3/8) possuíam animais reagentes. Os grupos de animais sororreagentes e não sororreagentes não diferiram entre si quando avaliado os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, tanto para as vacas quanto para as bezerras ( $p > 0,05$ ). A expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 foi menor, apesar de não significativamente, em bezerras e vacas soropositivas em relação às soronegativas ao *Neospora caninum*.

**Palavras-chave:** Neosporose. Bovinos. Periparto. Abortamento.

FRIGOTTO, Tiago Andre. **Neospora caninum in dairy cows and heifers from western Paraná**: Association between seropositivity and history of abortion, and the gene expression of cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10. 2017. 61 p. Thesis (Doctoral Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

The protozoan *Neospora caninum* is considered one of the main causative agents of abortion in dairy cattle, promoting severe economic damages to the activity. There are two forms of transmission, and transplacental is the most important way to maintain infection in the herd. During gestation of infected cows, there is an immune response of the host to the parasite by the production of inflammatory cytokines, such as Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) and Interleukin 10 (IL-10), in order to contain *N. caninum* infection preventing abortion. The objectives of this study were initially to associate the presence of antibodies against *N. caninum* with a history of abortion in dairy cows. The objective was to evaluate the prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in newborn dairy cows and their progeny; and the gene expression of the proinflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10 at the maternal-fetal interface to characterize the immune responses that occur in association with *N. caninum* infection in parturient cows and their progenies. The serology was performed by means of the indirect immunofluorescence (IFI) reaction (considered positive when the titers were greater than or equal to 1:100) and the cytokine gene expression was performed by qPCR (from leucocyte potato cells) and evaluated by the Relative Quantification (QR) method. A total of 46 dairy cows were evaluated in nine dairy farms that had cows with a history of abortion, 28 with a history of one or more abortions and 18 with no history of abortion. The serum antibody count against *N. caninum* was 39.1% (18/46) among cows with a history of abortion of 57.1% (16/28) and 11.1% (2/18) in non-aborted cows. Among the seropositive cows, 88.9% had a history of abortion. All evaluated properties showed animals with antibodies against *N. caninum*. Seropositive cows were 10.6 times more likely to be sero-reactive to *Neospora caninum* than cows without a history of abortion, concluding that there is an association between the history of abortion and the presence of antibodies against *Neospora caninum*. For the determination of the occurrence of anti-*N. caninum* antibodies and the gene expression of cytokines in dairy cows and seroreagent heifers, eight dairy farms from four municipalities in the western region of Paraná were used. Blood samples were collected from cows and progenies on the first day after delivery, totaling 54 adult animals and 55 heifers (there was a twin delivery). New harvest was performed on calves at six months of age. The occurrence of antibodies anti-*N. caninum* in newborns was 9.23% and progenies at birth was 23.2%. At six months of age, 23% (3/13) of the calves were again seroreactive. In the eight monitored herds, 37.5% (3/8) had reactive animals. The groups of seroreagent and non-seroreagent animals did not differ when evaluating IFN- $\gamma$  and IL-10 levels for both cows and heifers ( $p > 0.05$ ). Gene expression of the cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10 was lower, although not significantly, in heifers and cows seropositive in relation to seronegative to *Neospora caninum*.

**Keywords:** Neosporosis. Cattle. Peripartum. Abortion.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Ocorrência de anticorpos anti-Neospora caninum em bovinos leiteiros no Brasil até 2016. ....	17
<b>Tabela 2</b> – Porcentual de animais soronegativos e soropositivos ao N. caninum e o histórico de abortamento. ....	38
<b>Tabela 3</b> – Resultados da sorologia por IFI e titulação nas bezerras reagentes ao Neospora caninum no primeiro dia após o nascimento e aos seis meses de idade, filhas de vacas reagentes ou não reagentes ao parto. ....	50
<b>Tabela 4</b> – Expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 em leucócitos de vacas e bezerras soropositivas e soronegativas ao Neospora caninum pela técnica da qPCR em tempo real. Média e desvio-padrão dos valores em Quantificação Relativa (QR). ....	54

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	CICLO BIOLÓGICO .....	13
2.1.1	Transmissão fecal-oral .....	13
2.1.2	Transmissão transplacentária .....	15
2.2	EPIDEMIOLOGIA .....	16
2.3	IMUNOLOGIA .....	18
2.4	SINAIS CLÍNICOS .....	19
2.5	DIAGNÓSTICO.....	19
2.6	CONTROLE.....	21
2.7	IMPACTO ECONÔMICO .....	23
	REFERÊNCIAS .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3.1	OBJETIVO GERAL .....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4</b>	<b>ARTIGO A – ASSOCIAÇÃO DO HISTÓRICO DE ABORTAMENTO COM A PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-Neospora caninum EM VACAS LEITEIRAS</b> .....	34
<b>5</b>	<b>ARTIGO B – Neospora caninum: EFEITO NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN-<math>\gamma</math> E IL-10 EM VACAS LEITEIRAS PARTURIENTES E SUAS PROGÊNIES</b> .....	45
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

A produtividade leiteira de uma fêmea bovina é iniciada após o parto, sendo, portanto, dependente da eficiência reprodutiva, a qual é determinada, principalmente, pela concepção, gestação e parto.

Globalmente, a estimativa média total de prejuízos causados pelo *Neospora caninum* excedeu U\$1,298 bilhões ao ano (podendo chegar a U\$2,38 bilhões), sendo que aproximadamente duas de três partes dessas perdas (U\$1,58 bilhões) estão relacionadas aos bovinos leiteiros (REICHEL et al., 2013). Reichel et al. (2013) e Nicolino (2015), estimaram para o Brasil custos relacionados ao *N. caninum* em torno de R\$291 milhões e U\$51,3 milhões, respectivamente. Assim, a neosporose pode estar tomando aproximadamente 1% do valor bruto da atividade leiteira no Brasil, atividade esta com relevante importância socioeconômica.

Dados estimativos informam que em 2015 a produção leiteira no Brasil foi de 34 bilhões de litros, produzidos por 22 milhões de vacas, tornando o Brasil o quarto maior produtor de leite entre todos os países com esta atividade. Estima-se também que havia 1,3 milhões de propriedades leiteiras em 99% dos municípios do país. O valor bruto da produção de leite totalizou R\$28,9 bilhões naquele ano (ZOCCAL, 2016).

A infecção pelo *N. caninum* em bovinos tem sido, a partir da sua descoberta em 1988 por Dubey e colaboradores, verificada em todo o mundo. Atualmente é aceita como importante causa de abortamentos em bovinos de leite e corte, sendo em alguns países a maior causa de falhas reprodutivas, promovendo consideráveis perdas econômicas (WOUDA, 2005; GUIMARÃES JÚNIOR e ROMANELLI, 2006; REICHEL et al., 2013).

A principal forma de transmissão do agente em bovinos é pela via transplacentária. No entanto, ainda que exista a possibilidade das bezerras (futuras fêmeas gestantes) nascerem livres do parasita, podem se infectar pela forma fecal-oral, mantendo a neosporose no rebanho.

Exames sorológicos são úteis na detecção de anticorpos específicos contra a infecção pelo *Neospora* spp. nos bovinos adultos e conseqüentemente na possibilidade de controle da doença nos rebanhos. Entretanto, para uma maior eficiência no controle e erradicação da doença nos rebanhos, a realização de testes com maior especificidade como a PCR e a imunohistoquímica, realizadas a partir de células sanguíneas ou teciduais, torna-se essencial para que o agente seja definitivamente identificado, principalmente em vacas parturientes e em suas progênes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO – NEOSPOROSE EM BOVINOS LEITEIROS

*Neospora caninum* é um protozoário, pertencente ao filo Apicomplexa, classe *Sporozoa*, subclasse *Coccidiasina*, ordem *Eucoccidiorida*, família *Sarcocystidae*; classificação esta feita por meio de estudos morfológicos realizados com microscopia eletrônica e análise do sequenciamento de DNA (ELLIS, 1998).

Parasita intracelular obrigatório, o *N. caninum* apresenta semelhanças com o *Toxoplasma gondii* e o *Sarcocystis* spp., no entanto, com características distintas em relação à estrutura antigênica, imunogênica e patogênica relacionada ao hospedeiro (DUBEY et al., 1988). Estes autores o identificaram pela primeira vez em 1988, em cães com encefalomielite, sendo esta sintomatologia confundida anteriormente com a toxoplasmose (causada pelo *Toxoplasma gondii*). Em bovinos foi isolado primeiramente em fetos abortados Conrad et al. (1993), e no Brasil, o parasita foi diagnosticado pela primeira vez no Mato Grosso do Sul (MS) por Brautigam et al. (1996), sendo a partir de então, diagnosticada em outros estados.

Ainda que existam diversas espécies de hospedeiros, o parasita é mais importante economicamente em bovinos (hospedeiros intermediários). A neosporose bovina é hoje uma doença de interesse mundial, causando graves impactos econômicos nas indústrias de leite e de carne (ALMERIA; LOPEZ-GATIUS, 2015), sendo considerada uma das principais doenças reprodutivas de bovinos em todo o mundo, causando abortamento e mortalidade perinatal (GUIDO et al., 2016).

### 2.1 CICLO BIOLÓGICO

O *Neospora caninum* apresenta um ciclo de vida envolvendo três estágios principais: oocistos (hospedeiro definitivo), taquizoítos (forma de replicação aguda) e bradizoítos (forma crônica); e duas formas de transmissão, fecal-oral e transplacentária (McALLISTER et al., 1998).

#### 2.1.1 Transmissão fecal-oral

No cão, assim como em outros integrantes do gênero *Canis*, os hospedeiros definitivos da neosporose, o *Neospora caninum* na forma de taquizoítos se reproduz dentro do trato intestinal lançando no ambiente, pelas fezes, os oocistos não esporulados (capazes de sobreviver por longos períodos após esporularem). Estes esporulam entre 24 a 72 horas,

formando dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. No ambiente, já esporulados, são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, no caso o bovino, por meio do consumo de água ou alimentos, principalmente pastagens. No intestino, os esporozoítos são liberados dos esporocistos invadindo as células do hospedeiro intermediário e transformando-se em taquizoítos. Estes se multiplicam rapidamente, agora de forma assexuada, invadindo e infectando diferentes tipos de células, provocando lesões teciduais e propagando-se, via hematogena, para outros tecidos do hospedeiro (células do sistema nervoso, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio dos túbulos renais e hepatócitos). Após a infecção, haverá um período de proliferação de taquizoítos, fazendo com que o animal infectado desenvolva anticorpos em uma tentativa de controle da infecção. Em seguida os taquizoítos se convertem em bradizoítos dentro das células do hospedeiro, permanecendo em latência na forma de cistos intracelulares (DUBEY et al., 1988; McALLISTER et al., 1998; BARTELS et al., 1999; LINDSAY et al., 1999; GOODSWEN et al., 2012; McALLISTER, 2016).

Cães, ao consumirem os cistos teciduais do hospedeiro intermediário infectam-se, completando desta forma o ciclo de vida do parasita (GOODSWEN et al., 2012).

Se novilhas ou vacas não infectadas ingerirem oocistos durante a gestação a infecção pode acometer a vaca e o feto, pois ultrapassa a placenta e infecta o feto, sendo esta forma de transmissão chamada de transplacentária (McALLISTER, 2016).

A relação entre a exposição ao oocisto ingerido, como ocorre com a exposição de um rebanho a partir do alimento contaminado, e as consequências reprodutivas, como a ocorrência de aborto, são importantes (GAY, 2006).

Trees et al. (2002) infectaram artificialmente três vacas com 600 oocistos às 10 semanas de gestação, e todas pariram bezerras não infectadas. Quatro meses após o parto as vacas eram soronegativas, embora seus cérebros fossem PCR-positivos.

Gondin et al. (2004) infectaram 19 vacas entre 70 e 176 dias de gestação com doses orais variando de 1.500 a 115.000 oocistos, 17 das 19 (89%) se tornaram soropositivas. A infecção transplacentária ocorreu em 6 dos 17 fetos e uma vaca abortou devido a neosporose aos 120 dias de gestação. Os autores concluíram que a probabilidade de infecção transplacentária aumenta com maiores doses de oocistos e com a gestação avançada. A menor dose de oocisto resultou em uma infecção congênita, e um único aborto foi associado com uma dose de 44 mil oocistos.

### 2.1.2 Transmissão transplacentária

Caso novilhas ou vacas possuam a infecção na forma latente e em seguida tornem-se prenhes, os bradizoítos alojados em cistos teciduais podem se reativar a taquizoítos em situações que promovam uma depressão do sistema imune da vaca, sendo transmitidos via hematogênica, atravessando a placenta e infectando o feto. A transmissão transplacentária pode ocorrer em outras gestações da mesma vaca e havendo a transmissão para o feto fêmea, caso esta torne-se gestante, o mesmo evento pode ocorrer, transmitindo assim o parasito para gerações futuras, podendo manter a neosporose no rebanho mesmo sem novas infecções pela via fecal-oral (McALLISTER, 2016).

A transmissão vertical ou transplacentária é a forma mais frequente de infecção pelo parasita, sendo uma importante forma de manutenção do agente no rebanho. Observa-se em vacas positivas na maioria das vezes, a não ocorrência de abortamentos, sendo assim, fêmeas podem nascer congenitamente infectadas e transmitir o agente para seus descendentes em várias gestações (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000).

Em rebanhos leiteiros canadenses, Pan et al. (2004) verificaram que a taxa de transmissão vertical da doença foi de 40,7%, no entanto, a taxa de bezerras infectadas e filhas de vacas soronegativas foi de 6,7%.

Taxas de transmissão vertical em rebanhos leiteiros também foram estimadas nos EUA e Canadá por Paré et al. (1996), Waldner et al. (2001) e Davison et al. (1999) verificando em 81, 94 e 95,2% dos rebanhos, respectivamente.

Macedo et al. (2013) demonstraram que a taxa de transmissão vertical do *N. caninum* foi de 11,6% em vacas leiteiras prenhas naturalmente infectadas. Além disso, verificaram que 42,5% dos animais avaliados apresentavam anticorpos anti-*N. caninum* no estado de Santa Catarina, Brasil.

Dubey; Schares; Ortega-Mora (2007) afirmam que o *N. caninum* é um dos microorganismos mais eficientes em atravessar a barreira transplacentária em bovinos, pois até 95% dos bezerros provenientes de fêmeas positivas podem nascer infectados.

Tanto na transmissão transplacentária como na fecal-oral o abortamento ocorre pela multiplicação do *N. caninum* na placenta ou no feto, promovendo lesões nestes. Se na placenta, ocorre o impedimento na oxigenação e nutrição do feto ou promovendo a secreção de prostaglandina, hormônio luteolítico, impedindo com que o corpo lúteo do ovário sintetize a progesterona, o hormônio mantenedor da gestação, promovendo conseqüentemente o abortamento principalmente entre o quarto e o sexto mês de gestação. No feto, o parasita

lesiona os tecidos fetais impedindo a homeostasia do organismo e conseqüentemente levando à morte fetal (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; GHANEM et al., 2009, ALMERÍA and LOPEZ-GATIUS, 2013).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Pesquisas têm mostrado diferentes ocorrências de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros no Brasil, utilizando-se principalmente dos métodos de diagnóstico ELISA e RIFI. Dados de pesquisas anteriores, a partir do ano de 2009 até 2016, obtidas por meio de consulta ao acervo de trabalhos disponíveis nos sites de busca de periódicos Pubmed e Scielo utilizando-se dos termos “neospora, dairy cattle, Brazil” são apresentadas na Tabela 1.

Corbellini et al. (2002) encontraram prevalência em torno de 10% de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros de propriedades do Rio Grande do Sul, não havendo correlação desses resultados com a presença de cães residentes nas propriedades estudadas e sim com a frequência de cães errantes ou silvestres presentes nas propriedades.

Em dois estudos realizados com cães do meio urbano e rural de um mesmo município do estado de Rondônia (AGUIAR et al., 2006), a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* foi de 8,3% na região urbana e 12,6% na região rural do município, indicando que, no meio rural, as fontes de infecção para os cães, como ingestão de placenta e fetos contaminados, bem como a possibilidade de caça e de ingestão de cistos teciduais em possíveis hospedeiros intermediários, parecem ser importantes na epidemiologia e manutenção do *N. caninum* nesse ambiente.

Segundo Thurmond e Hietala (1997) bovinos leiteiros sorologicamente positivos para *N. caninum* apresentam um risco 7,4 vezes maior de aborto, e uma vaca soropositiva que aborta tem 5,7 vezes mais risco de abortar na próxima prenhez. Uma associação entre soropositividade e abortos foi observada em 69,8% dos rebanhos bovinos sul mato-grossenses avaliados por Oshiro et al. (2007).

Anderson et al. (1995) verificaram que 42,5% dos fetos abortados estavam infectados com o *N. caninum*, concluindo que esse parasita foi a maior causa de abortos em rebanhos leiteiros do estado da Califórnia, EUA.

Silva et al. (2008), compararam a prevalência entre propriedades leiteiras com sistemas de criação extensiva e semi-intensiva no estado de Pernambuco, a qual foi de 36,7% e 11,1%, respectivamente, comprovando-se uma associação significativa entre maior

taxa de infecção em propriedades e tempo de permanência na pastagem. Pesquisas realizadas no início de século XXI demonstraram que a presença e o número de cães nas propriedades rurais podem funcionar como fatores de risco para a infecção e a ocorrência de abortamentos em bovinos, indicando uma associação entre a infecção em ambas as espécies (SÁNCHEZ et al., 2003). A eliminação dos oocistos pelas fezes do cão favorece a disseminação do parasita na pastagem e água consumida pelo hospedeiro intermediário, propagando a infecção pelo rebanho.

Tabela 1 – Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros no Brasil até 2016.

Região	Estado	Bovinos leiteiros	Teste/ponto de corte	Referência
	Paraná	20,1%	RIFI/1:100	Spiti (2016)
	Paraná	35,1%	RIFI/1:50	Rocha et al. (2015)
	Paraná	24,0%	RIFI/1:25	Langoni et al. (2013)
	Paraná	24,2%	RIFI/1:100	Camillo et al. (2010)
	Paraná	12,0%	RIFI/1:200	Ogawa et al. (2005)
Sul	Paraná	14,3%	RIFI/1:25	Guimarães Jr. et al. (2004)
	Santa Catarina	51,9%	RIFI/1:200	Lorenzetti et al. (2016)
	Santa Catarina	43,8%	RIFI/1:200	Klauck et al. (2016)
	Santa Catarina	23,1%	RIFI/1:200	Moura et al. (2012)
	Rio Grande do Sul	24,0%	RIFI/1:100	Pessoa et al. (2016)
	Rio Grande do Sul	17,8%	RIFI/1:200	Corbellini et al. (2005)
	Minas Gerais	21,7%	RIFI/1:200	Bruhn et al. (2012)
Sudeste	Minas Gerais	37,0%	RIFI/1:200	Santos et al. (2012)
	São Paulo	10,4%	RIFI/1:100	Cardoso et al. (2012)
Centro- oeste	Mato Grosso	53,5%	RIFI/1:200	Benetti et al. (2009)
	Tocantins	25%	RIFI/1:200	Martins et al. (2011)
Nordeste	Alagoas	7,7%	RIFI/1:200	Sousa et al. (2012)
	Maranhão	50,7%	RIFI/1:200	Teixeira et al. (2010)
Norte	Rondônia	10,6%	RIFI/1:100	Vilas Boas et al. (2015)

Por ser uma doença relativamente recente, produtores e técnicos não tem relacionado casos de aborto com a neosporose, sendo necessário mais trabalhos/pesquisas



que informem a prevalência do parasita nos rebanhos, assim como as formas de transmissão e prevenção.

### 2.3 IMUNOLOGIA

A presença de parasitas intracelulares promove a ação de mecanismos imunológicos mediados por células que reduzem a multiplicação dos agentes no hospedeiro reduzindo assim a parasitemia (ALMERÍA et al., 2011).

O mecanismo mais importante durante a gestação, com o intuito de amenizar as consequências do *N. caninum* no sistema reprodutivo, ocorre por meio de células T helper (Th), que regulam a resposta imune através da secreção de citocinas. Há citocinas inflamatórias (derivadas de células Th1), como por exemplo, o Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ), que desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro contra microorganismos intracelulares (imunidade celular); e citocinas antiinflamatórias (derivadas de células Th2), como a Interleucina 10 (IL-10), que promovem a ativação e manutenção da resposta imune humoral ou mediada por anticorpos (ALMERÍA et al., 2017). Segundo López-Gatius et al. (2007), existe uma relação entre a produção de IFN- $\gamma$  e um risco reduzido de aborto em vacas infectadas pelo *N. caninum*.

Acredita-se que a resposta imune protetora em relação ao *N. caninum* seja predominantemente pelas citocinas do tipo 1 (Th1), mas em fêmeas gestantes, respostas como as induzidas pelo IFN- $\gamma$  podem ser potencialmente prejudiciais e podem causar rejeição ou aborto do feto (ALMERÍA et al., 2010; QUINN et al., 2002). O IFN- $\gamma$  foi a citocina que apresentou a maior atividade positiva na interface materno-fetal em animais infectados, especialmente na carúncula. O papel desta citocina na placenta materna teria uma importância crucial na transmissão do parasita para o feto. Em animais naturalmente infectados, a produção de IFN- $\gamma$  tem sido relacionada à proteção contra o aborto, embora, o excesso de IFN- $\gamma$  possa resultar em morte fetal (ALMERÍA et al., 2011).

Durante a gestação, parece haver uma tendência de maior concentração de citocinas Th2 (IL-10), e não das Th1 (IFN- $\gamma$ ) que promoveriam proteção contra protozoários. De forma vantajosa, a maior concentração de Th2 está associada com a implantação bem sucedida do feto e a manutenção da gestação no início pela supressão de respostas inflamatórias locais (CHAOUAT; ZOURBAS; OSTOJIC, 2002; WEGMANN et al., 1993).

## 2.4 SINAIS CLÍNICOS

A maioria das manifestações em bovinos são subclínicas. O abortamento é o principal sinal clínico da infecção causada pelo *N. caninum*, não havendo, geralmente, outros sinais associados. O aborto pode ocorrer em qualquer fase da gestação, sendo mais frequente entre o quinto e sétimo mês (McALLISTER, 2016). Para Dubey (2003), a maioria dos abortos ocorre entre o quinto e o sexto mês e para Innes (2007) é mais frequente entre o terceiro e oitavo mês de gestação.

Entretanto, caso o aborto ocorra no início da gestação o diagnóstico da doença é mais difícil de ser realizado, pois na maioria das vezes o feto não é observado no ambiente pelos tratadores, principalmente nas criações a pasto.

A presença de cães em propriedades de criação bovinos é comum. Portanto, convivem no mesmo ambiente. Ocorrendo abortamentos, cães instintivamente acabam consumindo os fetos e os anexos fetais. Desta forma, como mencionado anteriormente, podem estar ingerindo taquizoítos ou cistos teciduais de animais com neosporose, conseqüentemente sendo infectados.

Os fetos podem morrer no útero sendo absorvidos ou mumificados. Pode haver natimortos, prematuros, bezerros podem nascer vivos com tamanho normal ou notavelmente menores, e vivos com a doença, apresentando sintomatologia nervosa com déficit parcial de transmissão nervosa na medula espinhal, diminuindo conseqüentemente a propriocepção de membros traseiros e impossibilitando a locomoção; se clinicamente normais, terão uma infecção crônica (DUBEY, 2003; GHANEM et al., 2009; ALMERÍA e LÓPEZ-GATIUS, 2013; McALLISTER, 2016).

Lindsay et al. (1996) afirma que a maioria dos bezerros com sinais clínicos devido a infecção pelo protozoário morrem dentro das primeiras quatro semanas de vida. A forma clínica tem sido relatada também em outras espécies de mamíferos (DUBEY, 2003). Os abortos podem ocorrer independentemente de a infecção na vaca ser aguda ou crônica (GHANEM et al., 2009).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

Diversas metodologias têm sido relatadas para diagnóstico do *N. caninum* (GHANEM et al., 2009). A princípio, confirmava-se a infecção por *N. caninum* por meio de exame post-mortem, em que se objetivava verificar a presença do agente nos tecidos.

Clinicamente há uma complexidade em se alcançar o diagnóstico clínico da neosporose, pois não há manifestações clínicas nos animais cronicamente infectados (MOTA et al., 2008). Normalmente há poucos parasitas no sistema nervoso central de animais infectados sendo, portanto, difícil de detectá-los (GHANEM et al., 2009).

Em bovinos vivos, a infecção por *N. caninum* foi diagnosticada inicialmente por sorologia, pela detecção de anticorpos específicos no soro, plasma ou leite (ALVAREZ-GARCIA et al., 2013). Os testes sorológicos são as ferramentas mais adequadas para avaliar a infecção por *N. caninum* em animais e contribuem com informações importantes para medidas de controle (CAMPERO et al., 2015). Técnicas alternativas, como a detecção de DNA do parasita por PCR no sangue ou sêmen, e a avaliação de citocinas pró-inflamatórias como marcadores de exposição ao parasita, também poderiam ser aplicadas. No entanto, a avaliação de citocinas são indicadores transitórios de infecção e absolutamente inespecíficas, estando presentes nos mais diversos processos inflamatórios presentes no corpo dos animais, sendo sua utilização limitada à investigação científica (OKEOMA et al., 2004).

As técnicas sorológicas que detectam anticorpos séricos específicos anti-*N. caninum* são utilizadas para demonstrar a infecção nos rebanhos bovinos a fim de determinar se a neosporose esta envolvida como doença da esfera reprodutiva. A transmissão congênita também pode ser avaliada mediante a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro pré-colostral de bezerros recém-nascidos, visto que nos bovinos não há transferência de anticorpos da mãe ao feto durante a gestação (THURMOND e HIETALA, 1995). Mesmo que um resultado positivo auxilie a identificar um animal infectado, um resultado negativo não descarta definitivamente a infecção, pois os anticorpos séricos, frente ao *N. caninum*, podem variar com a idade e a fase da gestação (THURMOND e HIETALA, 1995).

Os diagnósticos dos agentes causadores de aborto podem ser abordados por meio de monitoramento sorológico de fêmeas, ou necropsia de fetos abortados, ou uma combinação destes. As pesquisas sorológicas têm a vantagem de serem relativamente fáceis de executar, mas uma desvantagem é que eles só podem detectar evidências de alguns agentes específicos. Já exames feitos a partir de tecidos de fetos abortados proporcionam a melhor oportunidade para detectar uma grande variedade de doenças, entretanto, tem como desvantagens a necessidade de encontrar fetos abortados, o maior custo dos exames e questões logísticas no manuseio e envio das amostras (McALLISTER, 2016).

No momento do aborto, espera-se que as fêmeas afetadas tenham um alto nível de anticorpos específicos contra o patógeno causador. É possível que um único exame sorológico de uma vaca que abortou forneça um diagnóstico presuntivo de neosporose, mas

apenas se a quantidade de anticorpos for bastante elevada. Este título elevado de anticorpos para neosporose podem variar entre laboratórios de diagnóstico, por diferenças em aparelhos e técnicas empregadas para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* são utilizados (McALLISTER, 2016).

Uma abordagem sorológica mais fidedigna é feita com várias fêmeas que recentemente abortaram e compará-las com um número similar de fêmeas que não abortaram. Quanto maior o número de animais testados, maior o poder da comparação. Segundo McAllister (2016), para grandes rebanhos, uma regra é testar 10 ou mais animais por grupo. Resultados consistentes com a neosporose ou com outra condição, como a leptospirose, mostrarão que a maioria ou todas as fêmeas que abortaram são, de fato, soropositivas, enquanto que uma menor proporção dos animais normais pode ser sugestivo que sejam soropositivas. Geralmente há animais soropositivos no grupo controle, porque nem todos os animais infectados abortarão. A comparação estatística também pode ser realizada dos níveis médios de anticorpos em grupos abortantes e normais, com níveis mais elevados esperados em animais clinicamente afetados. Esta comparação pode ser essencial em rebanhos que têm uma soroprevalência muito elevada (McALLISTER, 2016). Antonello et al. (2015) sugere que para a determinação da soronegatividade para o *N. caninum* deve-se realizar ao menos duas amostragens em diferentes períodos gestacionais para redução do risco de resultados falsos negativos.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de análises histopatológicas, pela identificação de parasitas em lesões nos fetos abortados, ou por testes sorológicos que identificam anticorpos anti-*N. caninum*. Os testes sorológicos mais comumente utilizados para diagnosticar a neosporose bovina são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (GUIDO et al., 2016). Cabral et al. (2009) observaram lesões histológicas em amostras de coração, pulmão, fígado, rim, placenta e fígado por meio de exame histopatológico, imunohistoquímica e *nested*-PCR. Wouda et al. (1997) encontraram lesões histológicas em cérebro, coração e fígado por meio de imunohistoquímica.

## 2.6 CONTROLE

A alta resistência a vários antimicrobianos desenvolvidos para o controle dos protozoários faz com que haja um constante interesse comercial no desenvolvimento de vacinas e novas drogas para controle. Até o momento, existem vacinas contra a malária e

toxoplasmose desenvolvidas e em desenvolvimento, entretanto, para a neosporose, ainda não existe nenhuma vacina efetiva (GOODSWEN et al., 2012; REICHEL e ELLIS, 2009).

Vacinas eficazes para a neosporose bovina são extremamente necessárias para prevenir tanto a transmissão fecal-oral quanto a transplacentária. Diferentes vacinas foram produzidas, como vacinas vivas atenuadas, lisados de parasitas mortos, antígenos totais ou frações de antígenos de parasitas mortos e vacinas subunitárias (MONNEY e HEMPHILL, 2014). Embora uma vacina morta estivesse previamente disponível nos Estados Unidos, não era confiável e não está mais em produção (McALLISTER, 2016).

Qian et al. (2015) avaliaram a eficiência *in vitro* de diferentes princípios ativos com atividade ao *N. caninum*. Curcumina, artemeter, atrazina, toltrazuril e ponazuril exibiram atividade *in vitro*, fornecendo informações importantes para futuros trabalhos que objetivem encontrar um tratamento à neosporose. No entanto, até que formas efetivas de tratamento sejam criadas, métodos de controle devem ser criados e utilizados para amenizar as consequências negativas da doença.

Almería e López-Gatius (2013), Guido et al. (2016) e Dubey; Schares; Ortega-Mora (2007) recomendam as seguintes medidas de controle:

- Forma rigorosa de evitar o contato entre cães e rebanhos deve ser adotada. Os cães e outros canídeos selvagens devem ser impedidos de contaminar áreas de pastagem ou alimentos conservados.
- Garantir o adequado bem-estar da vaca, especialmente durante o segundo trimestre de gestação.
- Eliminar vacas soropositivas que tiveram dois ou mais abortos.
- Verificar se a involução uterina é normal logo após o aborto. As vacas infectadas com *N. caninum* podem ser inseminadas com alta probabilidade de concepção no primeiro mês após o aborto.
- Ainda que novilhas de reposição substituam as vacas, continuam sendo um risco de reintrodução da doença no rebanho. Portanto, as novilhas de reposição devem ser adquiridas de rebanhos livres de *N. caninum* e com excelente desempenho reprodutivo, sendo serologicamente testadas na fazenda de origem.
- Em geral, os testes de diagnóstico utilizados devem ser ajustados de modo a favorecer uma sensibilidade elevada. Devido às flutuações nos títulos de anticorpos em animais infectados, com a possibilidade de resultados falso-negativos, testes repetidos podem ser aconselháveis. Recomenda-se a repetição dos testes após um período de 4 a 6 semanas da introdução dos animais no rebanho e reteste de amostras duvidosas utilizando western blotting.

- Embora nem sempre seja prático, exigir o teste das mães das filhas que foram adquiridas pode ajudar na identificação de indivíduos falso-negativos e evitar sistematicamente a introdução de animais infectados, pela possibilidade de transmissão através da via vertical.
- Controle de roedores, pois estes podem ser reservatórios do *N. caninum*.
- Devem ser implementadas medidas para prevenir a contaminação da água pelas fezes dos hospedeiros definitivos.

Uma vez que as alternativas de controle forem implementadas, o monitoramento do rebanho deve ser mantido, pois o risco de reintrodução da doença não pode ser descartado completamente. Testar periodicamente um número representativo de animais por meio de sorologia individual para verificar a presença de anticorpos específicos contra o *N. caninum* pode ser aplicado em rebanhos livres de *N. caninum* para se avaliar a conservação do status de livre, assim como para os rebanhos que progridem para uma redução da soroprevalência (GUIDO et al., 2016).

## 2.7 IMPACTO ECONÔMICO

Desde a descrição do parasita, a infecção pelo *N. caninum* em bovinos tem sido reconhecida em todo o mundo e é atualmente aceita como importante causa de abortamentos em animais de leite e corte, sendo para alguns países a maior causa de falhas reprodutivas, promovendo consideráveis perdas econômicas (GUIMARÃES JÚNIOR e ROMANELLI, 2006; WOUDA, 2005).

O impacto econômico ocorre pelo aumento do intervalo entre lactações, quedas na produção de leite, redução da vida produtiva da vaca, aumento do descarte e da reposição das vacas, custo da inseminação artificial/transferência de embrião/fertilização *in vitro*, infecções uterinas secundárias, auxílio veterinário e técnicas de diagnóstico, além do valor dos fetos abortados. Levantamentos de custos causados pela doença em rebanhos leiteiros canadenses estimaram uma perda anual de CAD\$18,00 (dólares canadenses), ou aproximadamente US\$13,00 para cada fêmea infectada (HADDAD et al., 2005).

A perda econômica na maioria das fazendas é estimada em 2 a 5% da renda bruta ao ano, no entanto, em algumas fazendas pode ser de até 20%. Na Austrália, esta perda anual é estimada em US\$100 milhões (REICHEL e ELLIS, 2008).

Em bovinos leiteiros, um dos custos associados com aborto é a redução da produção leiteira da vaca devido ao prolongamento da lactação e do período seco. A sorologia positiva ao *N. caninum* não reduz a produção de leite, mas o que influencia negativamente na

produção é a ocorrência de aborto consequente à infecção (McALLISTER, 2016; HOBSON et al., 2002).

Nos EUA, a estimativa dos custos com a neosporose para a indústria leiteira foi de US\$546 milhões. A mesma estimativa, no Brasil, representa para o país US\$51,3 milhões (REICHEL et al., 2013).

Nicolino (2015) estimou que no Brasil os custos totais do *N. caninum* para a cadeia produtiva do leite, relacionados à produção leiteira, ao descarte precoce de vacas e ao aborto são de R\$291 milhões, sendo que o descarte prematuro dos animais foi a variável com maior influência sobre os custos. Considerando os três principais estados produtores de leite no Brasil, os custos estimados são de R\$104 milhões para Minas Gerais, R\$30 milhões no Paraná e R\$16 milhões no Rio Grande do Sul.

Segundo Reichel et al. (2013) a perda média anual estimada por propriedade leiteira foi de US\$1.600,00, e globalmente, estima-se em perdas de mais de US\$ 2 bilhões anualmente.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 71-77, 2006.

ALMERIA, S. et al. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 304–311, 2010.

ALMERIA, S. et al. Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite immunology**, v. 33, p. 517 – 523, 2011.

ALMERIA, S.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. **Research in Veterinary Science**, v. 95, p. 303–309, 2013.

ALMERIA, S.; LOPEZ-GATIUS, F. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. **Research in Veterinary Science**. v. 100, P. 169–175, 2015.

ALMERIA, S.; SERRANO-PEREZ, B.; LOPEZ-GATIUS, F. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 177–182, 2017.

ALVAREZ-GARCIA, G. et al. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 85–95, 2013.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 2, p. 417-464, 2000.

ANDERSON, M.L. et al. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 207, p. 1206–1210, 1995.

ANTONELLO, A. M. et al. Dinâmica sorológica de anticorpos contra *Neospora caninum* durante a gestação de vacas naturalmente infectadas. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.4, p. 553-559, 2015.

BARTELS, C.J.M. et al. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, p. 247-257, 1999.

BENETTI, A. H. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, supl. 1, p. 29-33, 2009.

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

BRUHN, F. R. P. et al. Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. **Tropical Animal Health Production**, p. 1-6, 2013.



CABRAL, A. D. et al. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009.

CAMILLO, G. et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p.1511-1513, 2010.

CAMPERO, L. M. et al. Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 47, n. 4, p.295-301, 2015.

CARDOSO, J. M. S. et al. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 553–557, 2012.

CHAOUAT, G.; ZOURBAS, S.; OSTOJIC, S. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 53, p. 241–256, 2002.

CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J. P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. From aborted fetuses. **Journal Parasitology**, v. 106, n.3, p. 239–249, 1993.

CORBELLINI, L.G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2002.

CORBELLINI, L.G.; SMITH, D. Neosporose bovina: estudo de fatores de risco em 60 propriedades leiteiras no estado do Rio Grande do Sul e levantamento de causas de aborto bovino com ênfase em *Neospora caninum*. **Acta Scientiae Veterinarie**. V. 33, n. 2, p. 231-231, 2005.

DAVISON, H.C. et al. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1683–1689, 1999.

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

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

DUBEY, J. P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 193, n.10, p.1259-1263, 1988.

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

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

GAY, J. M. Neosporosis in dairy cattle: An update from an epidemiological perspective. **Theriogenology**, v. 66, p. 629–632, 2006.

GHANEM, M. E. et al. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 389–392, 2009.

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

GOODSWEN, S. et al. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, genetics and evolution**, p. 1-18, 2012.

GUIDO, S. et al. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; ROMANELLI, P. R. Neosporose em animais domésticos. **Semina**, v. 27, n. 4, p. 665-678, 2006.

GUIMARÃES JUNIOR, J.S. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state. Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 1-8, 2004.

HADDAD, J. P. A. et al. Perdas na produção e custos no tratamento em rebanhos leiteiros canadense infectados com *Neospora caninum*. In: **Anais...** I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*. São Paulo, 2005.

HOBSON, J. C.; DUFFIELD, T. F.; KELTON, D. *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 221, p.1160-1164, 2002.

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

KLAUCK, V. et al. Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 46–49, 2016.

LANGONI, H. et al. Avaliação sorológica para *Neospora caninum* em propriedades de bovinos leiteiros com alterações reprodutivas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 1, p. 124-130, 2013.

LINDSAY, D. S. et al. Finding the cause of parasite – induced abortions in cattle. **Veterinary Medicine**, v. 21, p. 64-71, 1996.

LORENZETT, M. P. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros no oeste do estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 3, p. 243-249, 2016.

MACEDO, C. A. B. et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered dairy cows (*Bos taurus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 13-17, 2013.

MARTINS, N. E. X. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes do município de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 231-238, 2011.

McALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, M. M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, p. 443–463, 2016.

MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v. 140, p. 52-70, 2014.

MOTA, R. A.; FERRE, I.; FARIA, E. B. Situação da neosporose bovina no Brasil e métodos de diagnóstico. **Medicina Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 38-48, 2008.

MOURA, A. et al. *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle of Lages Municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Arquivos Medicina Veterinária**, v. 44, n. 2, p. 117-122, 2012.

NICOLINO, R. R. **Estimativa de custos associados à infecção por *Neospora caninum* em propriedades de exploração leiteira no Brasil**. 2015. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OGAWA, L. et al. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.312-316, 2005.

OKEOMA, C. M. et al. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 307-315, 2004.

OSHIRO, L. M. et al. 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.

PAN, Y. et al. Genetic susceptibility to *Neospora caninum* infection in Holstein Cattle in Ontario. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3967-3975, 2004.

PARÉ, J. et al. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calf hood mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, p.133–139, 1996.

PESSOA, G. A. et al. Impact of spontaneous *Neospora caninum* infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in grazing lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 519-27, 2016.

QIAN, W. et al. Activity of several kinds of drugs against *Neospora caninum*. **Parasitology International**, v. 64, n. 6, p. 597-602, 2015.

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

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora caninum* –How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1173 – 1187, 2009.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Re-evaluating the economics of neosporosis control. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 361–362, 2008.

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

ROCHA, J. X. et al. Levantamento sorológico de *Neospora caninum* em vacas da raça holandesa da microrregião de Francisco Beltrão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n.3, p. 396-399, 2015.

SÁNCHEZ, G.F. et al. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 23-26, 2003.

SANTOS, R. R. D. et al. Quantification of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cows in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 294-297, 2012.

SILVA et al. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 455-461, 2008.

SPITI, S. M. **Ocorrência de *Neospora caninum* em bovinos e cães de propriedades produtoras de leite de Ivaiporã – PR**. 2016. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes), Universidade Norte do Paraná, Araçongas.

SOUSA, M. E. et al. Seroprevalence and risk factors associated with infection by *Neospora caninum* of dairy cattle in the state of Alagoas, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 10, p. 1009-1013, 2012.

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

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

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practitioner**, v.29, p.60-63, 1995.

TREES, A. J. et al. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 147–54, 2002.

VILAS BOAS, R. et al. Infection by *Neospora caninum* in dairy cattle belonging to family farmers in the northern region of Brazil. **Brazilian Journal Of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 204-208, 2015.

WALDNER, C.L. et al. Reproductive performance of a cow-calf herd following a *Neospora caninum* associated abortion epidemic. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 42, p. 355–360, 2001.

WOUDA, W. et al. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 180-185, 1997.

WOUDA, W. Some aspects of the epidemiology of bovine neosporosis. In: I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*, 2005, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia, 2005.

ZOCCAL, R. Alguns números do leite. **Revista Balde Branco**, v. 86, n. 471, p. 58, 2016.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a infecção por *Neospora caninum* está associada com histórico de abortamento em vacas leiteiras e se influencia nos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias em vacas parturientes e neonatos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas leiteiras tem associação com histórico de abortamento.

Avaliar se vacas leiteiras no pós-parto recente e em suas progênes ao nascimento são positivas para *Neospora caninum*.

Determinar a expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em vacas leiteiras após o parto e nas progênes nas primeiras 24 horas após o nascimento.

Associar a expressão gênica com a soropositividade ao *Neospora caninum*.

Comparar a expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 entre vacas e bezerras naturalmente infectadas em relação às não infectadas.



#### 4 ARTIGO A

### ASSOCIAÇÃO DO HISTÓRICO DE ABORTAMENTO COM A PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM VACAS LEITEIRAS

### ASSOCIATION OF THE ABORTION HISTORY WITH THE PRESENCE OF ANTIBODIES ANTI-*Neospora caninum* IN DAIRY COWS

#### RESUMO

O *Neospora caninum* é um importante agente causador de abortos em bovinos leiteiros, promovendo severos prejuízos econômicos. Objetivou-se neste trabalho associar a presença de anticorpos contra *N. caninum* com histórico de abortamento em vacas leiteiras. Um total de 46 vacas leiteiras foram avaliadas, sendo 28 com histórico de um ou mais abortamentos e 18 sem histórico de abortamentos, provenientes de nove propriedades leiteiras. Para a detecção de anticorpos contra *N. caninum* foi realizada a reação de imunofluorescência indireta, sendo consideradas positivas quando os títulos foram maiores ou iguais a 1:50. A soro ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* entre todas as vacas avaliadas foi de 39,1% (18/46), entre as vacas com histórico de abortamento foi de 57,1% (16/28) e de 11,1% (2/18) nas vacas que não haviam abortado. Dentre as vacas soropositivas, 88,9% possuíam histórico de aborto. Todas as propriedades avaliadas apresentaram animais com anticorpos contra o *N. caninum*. Há uma associação entre vacas soropositivas para *N. caninum* e histórico de abortamento. Vacas soropositivas apresentaram 10,6 vezes mais chances de serem sororreagentes ao *Neospora caninum* do que vacas sem histórico de abortamento. Conclui-se que existe associação entre histórico de abortamento e presença de anticorpos contra *Neospora caninum*.

**Palavras-chave:** Neosporose, bovinos, prenhez, aborto.

## ABSTRACT

*Neospora caninum* is an important agent causing abortions in dairy cattle, causing severe economic losses. The objective of this study was to associate the presence of antibodies against *N. caninum* with a history of abortion in dairy cows. A total of 46 dairy cows were evaluated, of which 28 had a history of one or more abortions and 18 without a history of abortions, from nine dairy farms. For the detection of antibodies against *N. caninum* the indirect immunofluorescence reaction was performed, being considered positive when the titers were greater than or equal to 1:50. The serum antibody count against *N. caninum* was 39.1% (18/46) among cows with a history of abortion of 57.1% (16/28) and 11.1% (2/18) in non-aborted cows. Among the seropositive cows, 88.9% had a history of abortion. All evaluated properties showed animals with antibodies against *N. caninum*. There is an association between seropositive cows for *N. caninum* and history of abortion. Seropositive cows were 10.6 times more likely to be sero-reactive to *Neospora caninum* than cows without a history of abortion. We conclude that there is an association between the history of abortion and the presence of antibodies against *Neospora caninum*.

**Key words:** Neosporosis, bovine, pregnancy, abortion.

## INTRODUÇÃO

O *Neospora caninum* vem sendo relatado em diversos países, inclusive o Brasil, como a principal causa de abortos em rebanhos de bovinos leiteiros e de corte (ALMERÍA; LÓPEZ-GATIUS, 2015). É um protozoário da classe Apicomplexa, que primeiramente foi descrito em caninos e, mais tarde, foi relacionado a abortos e infecção neonatal em bovinos, equinos, ovinos e caprinos (DUBEY, 2003). Os hospedeiros definitivos do protozoário são os canídeos, que podem ser infectados após a ingestão de cistos teciduais (McALLISTER, 1998).

Bovinos apresentam problemas de ordem reprodutiva como abortos, natimortos e morte neonatal (HADDAD et al., 2005). De acordo com Melo et al. (2001) desde a sua descoberta, o *N. caninum* vem sendo associado a consideráveis prejuízos econômicos em toda a cadeia leiteira, pois vacas infectadas por *N. caninum* possuem três vezes mais chances de abortarem do que vacas sadias. Citam que também existem diversos custos relacionados diretamente à infecção por *N. caninum* e dentre eles podem ser citados os fetos abortados, custos com novas inseminações ou cobrições, redução da vida útil da vaca, queda na produção de leite devido ao aumento do intervalo entre partos.

A infecção pelo *N. caninum* em bovinos tem sido, a partir da sua descoberta em 1988 por Dubey e colaboradores, presenciada em todo o mundo. Para alguns países é considerada a maior causa de falhas reprodutivas, promovendo consideráveis perdas econômicas (GUIMARÃES JÚNIOR e ROMANELLI, 2006; WOUUDA, 2005).

Globalmente, a estimativa média total de prejuízos causados pelo *Neospora caninum* excedeu U\$1,298 bilhões ao ano (podendo chegar a U\$2,38 bilhões), sendo que aproximadamente duas de três partes dessas perdas (U\$1,58 bilhões) estão relacionadas aos bovinos leiteiros (REICHEL et al., 2013). Reichel et al. (2013) e Nicolino (2015), estimaram para o Brasil custos relacionados ao *N. caninum* em torno de R\$291 milhões e U\$51,3 milhões, respectivamente. Assim, a neosporose pode estar tomando aproximadamente 1% do valor bruto da atividade leiteira no Brasil, atividade esta com relevante importância socioeconômica.

Técnicas sorológicas que detectam anticorpos séricos específicos anti-*N. caninum* são utilizadas para demonstrar a infecção nos rebanhos bovinos a fim de determinar se a neosporose está envolvida na ocorrência de abortamentos (THURMOND e HIETALA, 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* está associada com histórico de abortos em vacas leiteiras.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR (protocolo nº 0971).

### **Área de Estudo e Propriedades**

A cidade de Marechal Cândido Rondon (24° 33' 24"S/54° 3' 24"O), localizada na região oeste do Estado do Paraná, encontra-se a 420 metros de altitude. O clima é subtropical, com temperatura média anual superior a 20,1°C, com chuvas distribuídas ao longo do ano, especialmente no verão.

De acordo com o último censo pecuário, o município ocupa a oitava posição entre os maiores produtores de leite do Brasil (IBGE, 2015).

Foi realizado um estudo de caso/controle em nove propriedades selecionadas por conveniência e atendidas pelo mesmo Médico Veterinário. Cada uma possuía média de 42 vacas em lactação e histórico de abortamentos. O manejo sanitário contempla exames de brucelose e anual e vacinas contra leptospirose, IBR e BVD semestralmente.

### **Material Biológico**

Entre o período de março a dezembro de 2014, foram coletadas ao total 46 amostras de sangue de vacas leiteiras, sendo 28 amostras de animais com histórico de um ou mais abortos e 18 amostras de vacas sem histórico de abortamento. Estas eram vacas lactantes, ou seja, que haviam parido ao menos uma vez. O soro extraído foi armazenado a -20°C até a realização da técnica de imunofluorescência indireta (IFI).

Os abortamentos eram determinados pela visualização do feto abortado ou pelo diagnóstico reprodutivo via ultrassonografia ou por palpação retal.

### **Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum***

A determinação dos títulos dos anticorpos IgG anti *N. caninum* foi realizada por meio da técnica de IFI de acordo com Conrad et al. (1993).

Para a realização da técnica, as lâminas para pesquisa de anticorpos foram preparadas com formas de taquizoítos brutos de *Neospora caninum* (cepa Nc-1) e foram consideradas

positivas (reagente) quando os títulos foram maiores ou iguais a 50 (VENTURINI et al., 1999). O conjugado utilizado foi anti-IgG de bovino (FITC – Sigma-Aldrich®). As amostras consideradas positivas foram diluídas sequencialmente na base dois até tornarem-se negativas e controles positivo e negativo também foram incluídos em todos os testes.

### Análise Estatística

A análise de associação entre as variáveis histórico de abortamento e a soropositividade ao *N. caninum* foi realizada pelo teste qui-quadrado ( $X^2$ ) ou o teste exato de Fisher através do software EpiInfo v-6, sendo considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ . A magnitude da associação foi verificada pelo cálculo do Odds Ratio (OR) considerando um intervalo de confiança de 95%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais com histórico de abortamento tiveram 10,6 (IC 95% 1,17 – 82,8;  $p=0,004$ ) vezes mais chances de apresentarem anticorpos anti-*N. caninum* em relação aos animais sem histórico de abortamento. A frequência de animais sororreagentes observada no grupo com histórico de abortamento (caso) foi 16/28 (57%), enquanto no grupo sem histórico (controle) 2/18 (11,1%). Quando avaliados somente os 18 animais soropositivos, observou-se que 16 (88,9%) possuíam histórico de abortamento (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência de animais soronegativos e soropositivos ao *N. caninum* dos animais com e sem histórico de abortamento.

Abortamentos	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
<b>Caso</b>	16 (57,1)	12 (42,8)	28 (60,9)
<b>Controle</b>	02 (11,1)	16 (88,9)	18 (39,1)
<b>Total</b>	18 (39,1)	28 (60,9)	46 (100)

\* = OR = 10,6 (1,77 < OR < 82,8),  $p=0,004$

Todos os animais positivos apresentaram título de anticorpos contra *N. caninum* abaixo de 400. Estes títulos revelam que não havia infecção aguda/ativa. Para ser considerada como tal, os títulos devem ser iguais ou superiores a 800 (RAGOZZO et al., 2003).

Estima-se que o risco de aborto devido ao *N. caninum* em vacas leiteiras no Brasil seja de 10,04%, promovendo, portanto, mais de 474 mil abortamentos por ano, causando

consequentemente severas perdas econômicas para a atividade leiteira (NICOLINO et al., 2015).

Para Dubey et al. (1997) a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em soros de vacas com histórico de aborto é um indicativo que houve exposição materna ao protozoário, mas pode não ser a causa principal do aborto. Entretanto, a verificação de altos títulos em casos de vacas que abortaram sugere que o diagnóstico seja de infecção pelo *N. caninum*.

Ainda que neste trabalho não houvesse vacas soropositivas com títulos iguais ou superiores a 800, o alto percentual (88,9%) de animais soropositivos que já abortaram ao menos uma vez sugere que os abortamentos possam ter ocorrido devido à neosporose, pois evidentemente a maior titulação sorológica ocorre durante a gestação, onde a fêmea ativa seu sistema imune objetivando controlar a infecção, já que o parasita está ativo e danificando o feto ou a placenta, podendo provocar o aborto consequentemente (ALMERÍA; LÓPEZ-GATIUS, 2015).

Todas as propriedades analisadas neste trabalho apresentaram animais sororreagentes ao *N. caninum*. Estudos de levantamento epidemiológico realizados em diferentes estados do Brasil, apontam a presença do parasita variando de 91,7 a 100% das propriedades (GALVÃO et al., 2011; CAMILLO et al., 2011; MARTINS et al., 2011).

Yániz et al. (2008) monitoraram taxas de aborto em vacas leiteiras, encontrando diferenças significativas entre soropositivas (23,6%) e soronegativas (2,3%) para o *N. caninum*. A associação entre o histórico de aborto e a presença de anticorpos contra o *N. caninum* em rebanhos bovinos do estado do Rio Grande do Sul foi avaliada por Hein et al. (2012) que verificaram uma significativa relação entre aborto e soropositividade para o *N. caninum*, pois 58,5% de vacas soropositivas possuíam histórico de aborto e 16,4% das vacas soropositivas não haviam abortado. Corbellini et al. (2002) verificaram que 23,3% das vacas que abortaram eram soropositivas e 8,3% das vacas soropositivas não haviam abortado, sendo encontrada uma associação entre ao *N. caninum* e abortos. Hall et al. (2005) verificaram abortos em 31,3% das vacas soropositivas e apenas 2,4% em vacas soronegativas.

Neste trabalho, o percentual de vacas soropositivas que apresentaram ao menos um aborto quando comparado aos resultados encontrados por outros pesquisadores mostra que a neosporose no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, pode ser a principal causa de abortos em bovinos leiteiros, já que 57,1% das vacas com histórico de aborto eram soropositivas ao *N. caninum*.

Andreotti et al. (2010) verificaram uma perda de prenhez (reabsorção e/ou abortos) 15% maior em vacas soropositivas quando comparado às vacas soronegativas, afirmando que

a presença do *N. caninum* em rebanhos bovinos é um fator relevante à eficiência reprodutiva das fêmeas. Galvão et al. (2011) observaram uma associação significativa entre a exposição ao agente e a presença de abortos e na ocorrência de natimortos, considerando que a ocorrência de aborto foi 3,76 vezes mais frequente em vacas soropositivas em relação às soronegativas e a presença de natimortos foi 7,44 vezes mais frequente em vacas soropositivas.

Para Paré et al. (1997), o risco de aborto para vacas soropositivas ao diagnóstico ou durante a gestação é duas vezes maior que para vacas soronegativas ao *N. caninum*. Wouda et al. (1998), Hernandez et al. (2002), Hein et al. (2012), Corbellini et al. (2002) e Yániz et al. (2008) constataram que esse risco foi 3, 2,8, 7,21, 3,3 e 3,2 vezes maior, respectivamente. Neste trabalho, verificou-se que o risco de abortamento em vacas soropositivas foi 10,6 vezes maior quando comparado às soronegativas.

Segundo Thurmond e Hietala (1996), rebanhos de vacas com soroprevalência para o *N. caninum* entre 10% a 20% ou acima de 20%, mostraram que a ocorrência de abortos pode ser frequente e durante o ano todo. Também, Antoniassi et al. (2013), avaliando a causa de abortos em fetos bovinos no estado do Rio Grande do Sul, verificaram que 33% dos fetos estavam infectados com *N. caninum*.

Wouda et al. (1998) verificaram que em cada dez abortos em vacas soronegativas, dois (20%) podem ser devido a uma infecção por *N. caninum*, sugerindo que pode haver um baixo nível de infecção pós-natal, ou seja, que a principal via de transmissão da doença é a transplacentária. Sugerem ainda que fêmeas jovens soropositivas não devem ser utilizadas na reposição de vacas para diminuir um futuro risco de aborto no rebanho.

Além do *N. caninum*, outros agentes infecciosos podem causar abortos em bovinos. Animais podem estar acometidos por mais de um agente, fato que pode interferir no diagnóstico definitivo por meio de exames laboratoriais, como verificado por Santos et al. (2005). Estes, realizaram a sorologia em vacas de rebanhos leiteiros com histórico de aborto na região norte de estado do Paraná para verificar a presença de anticorpos contra os protozoários *N. caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., *Brucella abortus*, BHV-1 e BVDV. Observaram que dos 60% dos animais que apresentaram sorologia compatível com infecção por um ou mais agentes, em todos havia soropositividade para o *N. caninum*, mostrando, ainda que a neosporose tenha sido a mais presente, que outras enfermidades podem estar promovendo abortos nos animais.

## CONCLUSÃO

Nos animais avaliados neste estudo, verificou-se que vacas com histórico de abortamento apresentaram maiores chances de serem sororreagentes ao *Neospora caninum* do que vacas sem histórico de abortamento.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária (FA) e as instituições de ensino superior pelo financiamento da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ALMERIA, S.; LOPEZ-GATIUS, F. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. **Research in Veterinary Science**. v. 100, P. 169–175, 2015.

ANDREOTTI, R. et al. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 119-123, 2010.

ANTONIASSI, N. A. B. et al. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.155-160, 2013.

CAMILLO G. et al. Reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras coletivas de leite. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1600-1604, 2011.

CAMILLO, G. et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p.1511-1513, 2010.



CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J. P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. From aborted fetuses. **Journal Parasitology**, v. 106, n.3, p. 239–249, 1993.

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2002.

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

DUBEY, J.P. et al. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1063-1069, 1997.

GALVÃO, G. S. et al. Soropositividade para *Neospora caninum* e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros do sudeste da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, n. 4, p. 234-237, 2011.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; ROMANELLI, P. R. Neosporose em animais domésticos. **Semina**, v. 27, n. 4, p. 665-678, 2006.

HADDAD, J. P. A.; DOHOO, I. R.; VANLEEWEN, J. A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle – a Canadian perspective. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 230-243, 2005.

HALL, C. A., REICHEL, M. P., ELLIS, J. T. *Neospora* abortion in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.231-241, 2005.

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

HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows.

**Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 12, p. 1741-1746, 2002.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Pesquisa Pecuária Municipal. Brasília: Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão, 2015. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2015\\_v43\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2017.

MARTINS, N. E. X. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes do município de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 3, p. 231-238, 2011.

McALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**. v. 28, p. 1473-1478, 1998.

MELO, C. B. et al. Frequência de infecção por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produção de leite e fatores predisponentes à infecção em bovinos em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 67-74, 2001.

NICOLINO, R. R. et al. Estimating the abortion risk difference in *Neospora caninum* seropositive dairy cattle in Brazil. **Ciência Rural**, v.45, n.9, p. 1629-1633, 2015.

PARÉ, J.; THURMOND, M.C.; HIETALLA, S.K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortions. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 82-87, 1997.

RAGOZZO, A. M. A et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCE´RRECA, A. M.; GONDIM, L. F. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. **International Journal of Parasitology**, v. 43, p. 133–142, 2013.

SANTOS, A. P. M. E. et al. Dairy cow abortion associated with *Neospora caninum* and other infectious agents. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p.545-547, 2005.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practitioner**, v.29, p.60-63, 1995.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 1559-1562, 1996.

VENTURINI, M. C. et al. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1705-1708, 1999.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows that experienced a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v. 49, p. 1311-1316, 1998.

WOUDA, W. Some aspects of the epidemiology of bovine neosporosis. In: I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*, 2005, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia, 2005.

YÁNIZ, J. L. et al. Some factors affecting the abortion rate in dairy herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions are different in cows and heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 699-705, 2008.

## 5 ARTIGO B

### ***Neospora caninum*: EFEITO NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$ E IL-10 EM VACAS LEITEIRAS PARTURIENTES E SUAS PROGÊNIES**

### **Neospora caninum: EFFECTS ON GENE EXPRESSION LEVELS OF CYTOKINES IFN- $\gamma$ AND IL-10 IN DAIRY COWS AND THEIR PROGENIES**

#### **Resumo**

O *Neospora caninum* é considerado um dos principais causadores de abortamentos nos bovinos leiteiros em todo o mundo, promovendo severos prejuízos econômicos à bovinocultura. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a infecção pelo *Neospora caninum* interfere nos níveis de expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina 10 (IL-10) em vacas leiteiras parturientes e nas suas progênies. Em oito propriedades leiteiras de quatro municípios da região oeste do Paraná, foram colhidas amostras de sangue de vacas e das progênies no primeiro dia após o parto, totalizando 54 animais adultos e 55 bezerras. Nova colheita foi realizada nas bezerras aos seis meses de idade. Um dos partos foi gemelar. A determinação dos títulos dos anticorpos anti-IgG contra o *N. caninum* foi realizada por meio da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), foram consideradas positivas quando os títulos foram maiores ou iguais a 1:100. A expressão gênica das citocinas foi realizada pela qPCR e avaliada pelo método de Quantificação Relativa (QR). A ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* nas vacas recém-paridas foi de 9,2% (5/54) e das progênies ao nascimento foi de 12,5% (7/56). Aos seis meses de idade, 42,8% (3/7) das bezerras foram novamente sororreagentes. Nos oito rebanhos monitorados, 37,5% (3/8) possuíam animais reagentes. Os grupos de animais sororreagentes e não sororreagentes não diferiram entre si quando avaliado os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, tanto para as vacas quanto para as bezerras ( $p > 0,05$ ). A expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 foi menor, apesar de não significativamente, em bezerras e vacas soropositivas em relação às soronegativas ao *Neospora caninum*.

**Palavras-chave:** Neosporose, bovinos, periparto, inflamação, abortamento.

## Abstract

*Neospora caninum* is considered a major cause of miscarriage in dairy cattle worldwide, causing severe economic damage to bovine animals. The aim of the present study was to evaluate whether *Neospora caninum* infection interferes in the gene expression levels of the proinflammatory cytokines Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) and Interleukin 10 (IL-10) in parturient dairy cows and their progenies. In eight dairy farms from four municipalities in the western region of Paraná, blood samples were collected from cows and progenies on the first day after calving, totaling 54 adult animals and 55 heifers. New harvest was performed on calves at six months of age. One of the deliveries was twin. The determination of anti-IgG antibody titres against *N. caninum* was performed using the indirect immunofluorescence (IFI) technique, which were considered positive when titers were greater than or equal to 1:100. Gene expression of the cytokines was performed by qPCR and evaluated by the Relative Quantification (QR) method. The occurrence of anti-*N. caninum* in newborns was 9,2% (5/54) and progenies at birth was 12,5% (7/56). At six months of age, 42,8% (3/7) of the calves were again seroreactive. In the eight monitored herds, 37.5% (3/8) had reactive animals. The groups of seroreagent and non-seroreagent animals did not differ when evaluating IFN- $\gamma$  and IL-10 levels for both cows and heifers ( $p > 0.05$ ). Gene expression of the cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10 was lower, although not significantly, in heifers and cows seropositive in relation to seronegative to *Neospora caninum*.

**Key-words:** Neosporosis, bovine, peripartum, inflammation, abortion.

## INTRODUÇÃO

A neosporose tem sido relatada em todo o mundo como uma das causas de abortamento e natimortos, principalmente em bovinos leiteiros (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007), promovendo perdas econômicas que se estima ultrapassar mais de US\$800 milhões ao ano mundialmente (REICHEL et al., 2013), sendo de difícil controle e considerada a principal doença reprodutiva de bovinos em todo o mundo (GUIDO et al., 2016).

A transmissão transplacentária é a forma mais frequente de infecção pelo parasita, sendo uma importante forma de manutenção do agente no rebanho, pois na maioria das vezes não ocorre abortamentos, sendo assim, fêmeas podem nascer congenitamente infectadas e transmitir o agente para seus descendentes em gestações subsequentes, por várias gestações (ANDERSON et al., 2000).

Há mecanismos imunológicos mediados por células que são fundamentais no controle do *N. caninum* em bovinos. Os componentes mais importantes da resposta imune mediada por células durante a gestação são células T helper (Th), que regulam a resposta imune através de citocinas. As citocinas realizam funções essenciais na defesa do hospedeiro contra microorganismos intracelulares (ALMERÍA et al., 2017). Não há no Brasil pesquisas que monitoraram citocinas em vacas leiteiras recém-paridas e em suas progênes.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a infecção pelo *Neospora caninum* interfere nos níveis de expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina 10 (IL-10) em vacas leiteiras parturientes e nas suas progênes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR (protocolo nº 0971).

### Área de Estudo e Propriedades

Oito propriedades leiteiras pertencentes a quatro municípios da região oeste do estado do Paraná participaram do estudo. Uma delas com sistema confinado de criação, média de produção de 30 litros/vaca/dia e 80 vacas em lactação, todas da raça Holandesa; as outras sete propriedades possuíam sistema de criação semi-confinado, com média de

produção entre 16 e 28 litros/vaca/dia, e em média 40 vacas em lactação, sendo predominantemente animais das raças Holandesa e Jersey.

### **Coleta de Material Biológico**

Entre o período de maio de 2013 a março de 2014, foram colhidas amostras de sangue de vacas leiteiras no primeiro dia após o parto, totalizando 54 animais adultos. No mesmo instante foram coletadas amostras das progênes fêmeas destas vacas, totalizando 55 neonatos. Uma das vacas teve parto gemelar. Nova coleta, nas bezerras, foi feita aos seis meses de idade.

Não foi possível realizar a coleta de sangue das bezerras antes que consumissem o colostro.

Amostras de sangue foram colhidas através de venopunção da veia coccígea, jugular ou mamária com auxílio de Vacutainer®, em tubo sem anticoagulante e outro com EDTA. Após centrifugação a 700 G por 10 minutos, obtiveram-se amostras de soro. Amostras de sangue total e, após centrifugação a 700 G por 10 minutos, amostras de 0,3 ml de papa de leucócitos, com adição de 0,6 ml do reagente Trizol Reagent® - Invitrogen™ para conservação do RNA dos leucócitos, foram coletadas dos tubos com anticoagulante. As amostras foram mantidas em tubos de 1,5 ml, permanecendo armazenadas em freezer -80°C até a realização das análises.

### **Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum***

A determinação dos títulos dos anticorpos IgG anti-*N. caninum* foi realizada por meio da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) de acordo com Conrad et al. (1993).

Para a realização da técnica, as lâminas para pesquisa de anticorpos foram preparadas com formas de taquizoítos brutos de *Neospora caninum* (cepa Nc-1) e foram consideradas positivas (reagente) quando os títulos foram maiores ou iguais a 100 (VENTURINI et al., 1999). O conjugado anti-IgG de bovino (FITC – Sigma-Aldrich®) foi padronizado para cada reação. Controles, positivo e negativo, também foram incluídos em todos os testes.

## **Quantificação de citocinas**

A extração de RNA foi realizada a partir da papa de leucócitos armazenado com o Trizol Reagent® - Invitrogen™ seguindo as recomendações do fabricante.

Posteriormente, para construção de cDNA a partir de Transcriptase Reversa utilizou-se o kit ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs Inc.), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Após a obtenção de cDNA foi armazenado em freezer -20°C para posterior realização da qPCR.

Para realização da qPCR, foram realizados ensaios de expressão gênica através do sistema Taqman® Applied Biosystems utilizando primers inventoriados para análise de IFN- $\gamma$  e IL10 (IFN $\gamma$  - Bt03212723\_m1 ; IL-10 - Bt03212727\_m1) com GAPDH (Forward Primer GCC CCG CGC TCT AAT GTT / Reverse Primer CGA CCT TCA CCA TCT TGT CTC A / Probe ACC TTC CTC TGC CCA TAG CCG CA) utilizado como controle endógeno. Os ensaios foram conduzidos conforme orientações do fabricante. Resumidamente, 1 $\mu$ L de cDNA foi adicionado a 5  $\mu$ L de TaqMan®Universal Master Mix II, 0,5 $\mu$ L primer/probe (IFN- $\gamma$  e IL10), 1,5  $\mu$ L GAPDH mix (FW - 0,7  $\mu$ L; RV - 0,7  $\mu$ L; probe 0,1  $\mu$ L), 0,4  $\mu$ L BSA; H<sub>2</sub>O MilliQ 1,10  $\mu$ L. As amostras foram analisadas através do Software StepOne v2.2.2.

O gene de GAPDH foi utilizado para normalizar a PCR para a quantidade de RNA adicionado às reações de transcrição reversa. A quantificação dos níveis de expressão de mRNA de citocina foi realizada utilizando o método de Quantificação Relativa (QR) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

## **Análise estatística**

As diferenças na QR das citocinas IFN- $\gamma$  e IL10 entre animais soropositivos e soronegativos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney *U* Test, considerando-se  $P < 0,05$  como significativo.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*

A ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* nas vacas recém-paridas foi de 9,2% (5/54) e das progênieis ao nascimento foi de 12,5% (7/56). Nos oito rebanhos monitorados, 37,5% (3/8) apresentaram animais reagentes. Nas cinco vacas soropositivas ao parto, 100% (5/5) das suas filhas foram também reagentes ao *N. caninum*. No entanto, em três das sete bezerras reagentes ao nascimento (42,8%) tinham suas progenitoras não reagentes ao parto.

Das sete bezerras reagentes, apenas uma não havia consumido colostro antes da realização da coleta de sangue. A maioria dos partos bovinos ocorreu no início da manhã ou final da tarde. Desta forma, considerando que os neonatos bovinos iniciam a mamada do colostro aproximadamente 30 minutos após o nascimento, torna-se difícil a coleta de sangue de neonatos bovinos leiteiros antes do consumo do colostro (primeira secreção da glândula mamária). A Tabela 3 apresenta a titulação de anticorpos das bezerras sororreagentes ao nascimento e no sexto mês de idade, assim como a titulação das vacas sororreagentes ao parto.

Tabela 3. Resultados da sorologia por IFI e titulação nas bezerras reagentes ao *Neospora caninum* no primeiro dia após o nascimento e aos seis meses de idade, filhas de vacas reagentes ou não reagentes ao parto.

Bezerra N°	Vaca	Título	Bezerra	Título	Bezerra Sexto mês	Título
1	+	400	+	800	-	.
2	+	400	+	100	+	100
4	+	100	+	800	+	200
5	-	.	+	200	+	400
6	+	400	+	200	NR	.
20	+	400	+	200	-	.
42	-	.	+	100	-	.

Nota: NR: Não realizado; +: sororreagentes; -: soro não reagente; .: nenhum resultado.

Segundo Dubey; Schares; Ortega-Mora (2007) o *N. caninum* é um dos microrganismos mais eficientes em transmitir a doença pela via transplacentária em bovinos, pois aproximadamente 95% dos bezerros filhos de vacas soropositivas nascem infectados. Neste trabalho, verificou-se que 100% das bezerras filhas de vacas soropositivas foram

também sororreagentes ao nascimento, entretanto, tal porcentual não pode ser considerada válido, pois apenas uma das sete bezerras não havia consumido colostro antes da coleta, e os anticorpos colostrais podem promover reações sorológicas positivas até 21 semanas após o nascimento, devendo-se então excluir dos estudos de soroprevalência os bezerros que consumiram colostro até quatro meses de idade para impedir os resultados falso-positivos (CARDOSO et al., 2008).

Segundo Bartley et al. (2012), a resposta imune do feto também desempenha um papel crucial para o resultado da infecção. As respostas específicas de anticorpos e as respostas celulares do feto contra o *N. caninum* foram em torno do 100º dia da gestação em diante, havendo conseqüentemente a presença de imunoglobulinas que podem ser detectadas no soro do neonato. Assim, ainda que este não tenha ingerido o colostro, caso imunoglobulinas estejam presentes no soro é sugestivo de uma infecção intrauterina. Neste trabalho, a única das bezerras sorologicamente positivas ao nascimento que não ingeriu o colostro antes da coleta do sangue foi reagente também aos seis meses de idade sendo filha de vaca também reagente, mostrando que houve a transferência vertical e que a bezerra manteve-se reagente até a segunda coleta. Entretanto, para as outras seis bezerras soropositivas e que ingeriram colostro antes da coleta, a soropositividade não pode ser considerada uma resposta imune frente ao parasita durante o desenvolvimento fetal, pois imunoglobulinas podem ter sido transferidas passivamente via ingestão do colostro. Desta forma, nova avaliação sorológica foi realizada aos seis meses de idade. Nas sete bezerras sororreagentes ao nascimento, verificou-se que quatro destas não apresentaram novamente reatividade aos seis meses, sugerindo que a soropositividade ao nascimento foi pela ingestão de imunoglobulinas provindas do colostro. No entanto, não se pode desconsiderar a possibilidade das três bezerras terem se infectado pela via oral durante o intervalo de tempo do nascimento aos seis meses de idade.

A RIFI é o teste considerado padrão para o diagnóstico de neosporose, apesar da interpretação dos resultados ser subjetiva (CAMPERO et al, 2015). O título de anticorpos é um indicador indireto da exposição do sistema imune a antígenos do protozoário. Um aumento no título de anticorpos pode indicar reativação e multiplicação do *N. caninum*. Neste sentido, o aumento no título de anticorpos em fêmeas portadoras, durante a gestação, pode ser reflexo da reativação do protozoário (ANTONELLO et al., 2015). O título de corte entre um resultado soronegativo e um soropositivo pode ser estabelecido desde 1:25, entretanto, com este, considera-se a possibilidade de que o animal seja latentemente soropositivo e que o aborto tenha sido causado por outros agentes. De acordo com Antonello

et al. (2015), diminui-se a probabilidade de ocorrência de falsos positivos com a utilização da diluição de 1:200 do soro pela redução das reações sorológicas cruzadas entre outros protozoários do mesmo filo. No entanto, fica difícil a comparação entre laboratórios devido à utilização de diferentes pontos de corte.

Nogoreda et al. (2007) avaliaram a cinética de anticorpos anti-*N. caninum* durante a gestação de vacas leiteiras cronicamente infectadas. Observaram que existe um aumento ou estabilização na produção de anticorpos no terço médio da gestação ou antes mesmo da ocorrência do aborto. Ou seja, vacas infectadas podem não apresentar reação sorológica ao parto. Esta pode ser a justificativa do alto percentual (95,9%) de neonatos soropositivos filhos de vacas não reagentes ao parto neste trabalho. Otter et al. (1997) e Thurmond e Hietala (1995) afirmam que resultados negativos em testes serológicos não devem ser considerados conclusivos, pois algumas vacas infectadas ou mesmo bezerras podem não ter anticorpos circulantes no momento da coleta, podendo variar com a idade e a fase da gestação.

Santos et al. (2005) citam que existe um consenso entre pesquisadores sobre o uso estrito de testes sorológicos para a detecção da neosporose, sendo necessária a aplicação de outros testes diagnósticos, além de que a soronegatividade não pode excluir o *N. caninum* como causa de abortamento. Da mesma forma, Ghanem et al. (2009) afirmam que a presença de anticorpos anti-*N. caninum* nos fluidos corporais de fetos ou de neonatos indica a presença de infecção, mas a ausência de detecção de anticorpos não descarta a presença da neosporose.

Portanto, fica claro que o diagnóstico definitivo da neosporose é possível por meio da utilização de técnicas específicas como a imunohistoquímica, que identificam o agente no feto (CABRAL et al., 2009). Entretanto, é pouco comum observar o feto abortado no ambiente e há dificuldades logísticas para a realização dos exames. Em contrapartida, exames sorológicos são de fácil coleta, menor custo e de fácil acesso a laboratórios que os realizem. Além disso, há fatores imunológicos individuais de cada animal que podem estar reprimindo a resposta imunológica e consequentemente impedindo a detecção sorológica do agente, tornando o resultado obtido pouco útil ao solicitante (GUIDO et al., 2016).

### **Expressão gênica das citocinas nas vacas recém-paridas e nas bezerras**

Assim como em outros parasitas intracelulares, os mecanismos imunológicos mediados por células têm a atribuição de ser o mais importante na redução da

multiplicação do *N. caninum* no hospedeiro, reduzindo assim a parasitemia (ALMERÍA et al., 2011).

A interação entre o sistema imunológico materno e fetal tem sido sugerida, havendo uma replicação descontrolada do parasita dentro do feto imaturo resultando na circulação de grande número de parasitas de volta para a placenta, o que por sua vez leva a uma maior resposta imune materna (ROSBOTTOM et al., 2008). No entanto, ainda não está claro se os próprios parasitas, ou uma forte resposta imune inflamatória aos parasitas, que causam necrose das células epiteliais placentárias e conseqüentemente levam à morte do feto (ROSBOTTOM et al., 2011).

Vacas possuem mecanismos imunológicos mediados por células que promovem o controle do *N. caninum*, amenizando as conseqüências ao sistema reprodutivo. O mecanismo mais importante ocorre pela resposta imune mediada por células durante a gestação por meio de células T helper (Th), que regulam a resposta imune através da secreção de citocinas. Há citocinas inflamatórias (derivadas de células Th1), como por exemplo, o IFN- $\gamma$ , que desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro contra microorganismos intracelulares (imunidade celular); e citocinas antiinflamatórias (derivadas de células Th2), como a IL-10, que promovem a ativação e manutenção da resposta imune humoral ou mediada por anticorpos (ALMERÍA et al., 2017).

A imunidade envolvendo citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$  é intrínseca para o desenvolvimento da imunidade protetora do hospedeiro, e o IFN- $\gamma$  tem se mostrado ativo contra o *N. caninum* em bovinos experimentalmente infectados (LÓPEZ-GATIUS et al., 2007).

Há uma relação entre a produção de IFN- $\gamma$  e um risco reduzido de aborto em vacas infectadas com *N. caninum*. A resposta imune humoral contra *N. caninum* durante a gestação em vacas que não abortaram mas que são infectadas é diminuída em vacas com a presença de IFN- $\gamma$  em comparação com vacas sem IFN- $\gamma$ . O problema é tentar entender a maneira pela qual a produção de IFN- $\gamma$ , que raramente compromete a gestação em vacas cronicamente infectadas, poderia de fato ser protetora contra o aborto. Compreender essa questão-chave pode ser essencial para o sucesso de futuras terapias em vacas cronicamente infectadas (LÓPEZ-GATIUS et al., 2007).

Em animais naturalmente infectados, a produção de IFN- $\gamma$  tem sido relacionada à proteção contra o aborto, embora, o excesso de IFN- $\gamma$  possa resultar em morte fetal (ALMERÍA et al., 2011).

Neste trabalho, os grupos de animais sororreagentes e não sororreagentes não diferiram entre si quando avaliado os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, tanto para as vacas quanto para as bezerras ( $p > 0,05$ ). As médias de IFN- $\gamma$  apresentaram os seguintes valores entre animais soropositivos e soronegativos: vacas (0,68 e 0,75, respectivamente) e bezerras (0,49 e 1,04, respectivamente). Enquanto a IL-10 apresentou maior variação das médias entre os grupos soropositivos e soronegativos, sendo: nas vacas 0,12 e 1,03, respectivamente, e bezerras 0,56 e 3,8, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em leucócitos de vacas e bezerras soropositivas e soronegativas ao *Neospora caninum* pela técnica da qPCR em tempo real. Média e desvio-padrão dos valores em Quantificação Relativa (QR).

Categoria	Sorologia	IFN- $\gamma$	Valor de p	IL-10	Valor de p
Vacas	Soropositivas	0,68 $\pm$ 1,53	0,35	0,12 $\pm$ 0,26	0,21
	Soronegativas	0,75 $\pm$ 1,09		1,03 $\pm$ 1,48	
Bezerras	Soropositivas	0,49 $\pm$ 0,17	0,55	0,56 $\pm$ 0,38	0,72
	Soronegativas	1,04 $\pm$ 0,62		3,8 $\pm$ 9,21	

Desta forma, portanto, estes dados sugerem que houve uma resposta imune materna ativa na placenta em resposta ao parasita, mas importante é que a resposta não tenha ocorrido em excesso pela IFN- $\gamma$  não resultando em danos suficientes à placenta para causar morte fetal e o abortamento, e nem pela falta de IL-10 que não permitiria a manutenção da gestação, ou seja, houve possivelmente um equilíbrio entre respostas Th1 e Th2. Mesmo com uma menor presença do IFN- $\gamma$  nas vacas soropositivas em relação às soronegativas, não houve morte neonatal ou neonatos com sintomatologia nervosa.

A resposta imune fetal pode controlar o crescimento do parasita e conduzir a diferenciação dos taquizoítos aos bradizoítos, o que resulta em infecção persistente. A presença de uma resposta imune materna ativa na placenta não é por si só, fatal para o feto, embora não se pode descartar o fato de que a magnitude da resposta materna pode ser importante. No entanto, sugere-se que a competência imunológica fetal também pode ser um fator significativo na determinação ou não da ocorrência do aborto (ROSBOTTOM et al., 2011).

Estudos em camundongos mostraram que a proteção contra *N. caninum* é dependente da expressão de citocinas do tipo Th1, incluindo IL-12 e IFN- $\gamma$ , e a resposta imunitária em bovinos parece seguir um perfil semelhante, pois expressam níveis elevados de IFN- $\gamma$  em resposta ao antígeno parasitário (BASZLER et al. 1999). Consequentemente, a

patologia imunomediada foi proposta como uma possível causa de aborto após infecção por *N. caninum*.

Durante a gestação, parece haver uma tendência de maior concentração de citocinas Th2 (IL-10), e não das Th1 (IFN- $\gamma$ ) que promoveriam proteção contra protozoários. De forma vantajosa, a maior concentração de Th2 está associada com a implantação bem sucedida do feto e a manutenção da gestação no início pela supressão de respostas inflamatórias locais (CHAOUAT; ZOURBAS; OSTOJIC, 2002; WEGMANN et al., 1993). No entanto, nos terços médio e final da gestação, a vaca estaria mais susceptível a protozoários, não sendo capaz de controlar a infecção pelo *N. caninum* (LONG et al., 2000).

Observou-se neste trabalho que a QR da citocina IL-10 nas vacas soropositivas foi de 0,12 ( $\pm 0,26$ ) e nas soronegativas 1,03 ( $\pm 1,48$ ), ou seja, menor, mas sem diferença significativa.

O resultado da infecção por *N. caninum* depende do tempo de infecção, já que a infecção transplacentária na gestação precoce resulta na morte fetal, enquanto que, no final da gestação, o feto sobrevive, mas há chances de tornar-se persistentemente infectado (ROSBOTTOM et al., 2007). Portanto, como sugerido para a infecção por *Toxoplasma gondii*, pode ser que no início da prenhez a resposta Th1 protetora materna a *N. caninum* promova a perda gestacional, enquanto que no final da gestação uma resposta Th2 dominante a mantenha, mas permita a infecção do feto (ROSBOTTOM et al., 2007).

De acordo com Almería et al. (2011) a expressão aumentada de IL-10 é observada especialmente na carúncula, juntamente com a expressão significativamente aumentada de IL-10 observada nos fetos infectados poderia refletir no envolvimento desta citocina na supressão de inflamação local, pela regulação negativa da produção de monocinas e IFN- $\gamma$ . O aumento da produção de IL-10 também tem sido relacionado ao aumento da suscetibilidade de camundongos fêmea gestantes à infecção por *Leishmania* e a uma menor capacidade da fêmea em controlar as infecções por *N. caninum* durante a gestação (ALMERÍA et al., 2011).

Essencialmente as citocinas Th1, como o IFN- $\gamma$  e a IL-12 na imunidade contra *N. caninum*, tem sido indicadas. Em bovinos com a doença na forma crônica infectados naturalmente, um papel protetor do IFN- $\gamma$  também foi observado (KHAN et al., 1997; BAZSLER et al., 1999).

Em vacas naturalmente infectadas, foi detectado um risco de aborto 15,6 vezes maior em vacas soropositivas não produtoras de IFN- $\gamma$  do que em animais

seronegativos. A neosporose não promoveu risco de aborto em vacas soropositivas produtoras de IFN- $\gamma$  (LÓPEZ-GATIUS et al., 2007).

Hecker et al. (2015) avaliaram a expressão gênica pela imunohistoquímica e qPCR de IFN- $\gamma$  e IL-10 entre diferentes grupos que foram artificialmente infectados de diferentes formas pelo *N. caninum* aos 70 dias de gestação. Mensurações foram feitas aos 104 dias de gestação. Quando comparado ao grupo controle (de vacas não infectadas), verificaram que tanto a IFN- $\gamma$  como a IL-10 de vacas infectadas foram significativamente superiores.

Almería et al. (2011) infectaram novilhas prenhas aos 110 dias de gestação e avaliaram a expressão gênica pela qPCR de diversas citocinas Th1 e Th2 três semanas depois. Verificaram que a expressão gênica de IFN- $\gamma$  e IL-10 foram superiores em vacas infectadas em relação às controle, no entanto, sem diferenças significativas.

Contrariamente, neste trabalho, verificou-se que a expressão gênica, tanto do IFN- $\gamma$  como da IL-10, foram menores nas vacas soropositivas em relação às soronegativas, no entanto, sem diferenças significativas. Ainda que menores, destaca-se a inexistência de bezerros natimortos e mortalidade neonatal nas soropositivas.

Pode-se considerar que no terço final da gestação, apesar da baixa expressão gênica do IFN- $\gamma$ , este pode ter, além de protegido o feto contra o *N. caninum*, também mantido a gestação, já que em excesso pode ocasionar aborto ou rejeição do feto, conforme indicam as referências. Além disso, também no terço final de gestação, a IL-10 com menor QR nas soropositivas pode ter tornado as vacas menos susceptíveis ao agente, já que é destacada a sua ação, quando em elevada concentração, na manutenção da gestação pela supressão de respostas inflamatórias, mas em contrapartida, tornando a vaca mais susceptível ao *N. caninum*.

Não foram encontrados trabalhos que justificassem e explicassem a maior ou menor concentração de determinadas citocinas no colostro, havendo, portanto a necessidade de novas pesquisas que venham a sanar esta questão.

Almería et al. (2011) afirmam que o controle imunológico do parasita na placenta ou pelo feto poderia ser a chave para determinar o mecanismo do aborto e/ou a transmissão transplacentária para o feto.

## CONCLUSÃO

A expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 foi menor, apesar de não significativamente, em bezerras e vacas soropositivas em relação às soronegativas ao *Neospora caninum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERIA, S. et al. Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 517–523, 2011.

ALMERIA, S.; SERRANO-PEREZ, B.; LOPEZ-GATIUS, F. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 177–182, 2017.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 2, p. 417-464, 2000.

ANTONELLO, A. M. et al. Dinâmica sorológica de anticorpos contra *Neospora caninum* durante a gestação de vacas naturalmente infectadas. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.4, p. 553-559, 2015.

BARTLEY, P. M. et al. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. **Veterinary Research**, v. 43, n. 38, p. 1-12, 2012.

BASZLER, T. V. et al. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB / c mice. **International of Journal Parasitology**, v. 29, p. 1635–1646, 1999.

CABRAL, A. D. et al. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009.



CAMPERO, L. M. et al. Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 47, n. 4, p.295-301, 2015.

CARDOSO, J. M. S. et al. Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres da infecção. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 379-384, 2008.

CHAOUAT, G.; ZOURBAS, S.; OSTOJIC, S. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 53, p. 241–256, 2002.

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

GHANEM, M. E. et al. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 389–392, 2009.

GUIDO, S. et al. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

HECKER, Y. P. et al. Cell mediated immune responses in the placenta following challenge of vaccinated pregnant heifers with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v. 214, p. 247–254, 2015.

KHAN, I. A. et al. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 24–34, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LONG, M. T.; BASZLER, T. V. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 4768–4774, 2000.

LOPEZ-GATIUS, F.; ALMERIA, S.; DONOFRIO, G. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Theriogenology**, v. 68, p. 1067–1073, 2007.

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

OTTER, A. et al. Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. **Veterinary Record, London**, v.141, p.487-489, 1997.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCE´RRECA, A. M.; GONDIM, L. F. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. **International Journal of Parasitology**, v. 43, p. 133–142, 2013.

ROSBOTTOM A. et al. An upregulation of maternal cytokines is detected in the placenta of cattle infected with *Neospora caninum*, which is more marked early in gestation when foetal death is observed. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 2352–2361, 2008.

ROSBOTTOM, A. et al. Up Regulation of the Maternal Immune Response in the Placenta of Cattle Naturally Infected with *Neospora caninum*. **Plos One**, v. 6, n. 1, 2011.

ROSBOTTOM, A. et al. Bovine immune response in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 219–228, 2007.

SANTOS, A. P. M. E. et al. *Neospora caninum* in dairy cattle in Paraná State, Brazil: histological and immunohistochemical analysis in fetuses. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 559-562, 2005.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practitioner**, v.29, p.60-63, 1995.

VENTURINI, M.C. et al. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1705-1708, 1999.

WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol Today**, v. 14, p. 353–356, 1993.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo mostrou que há uma alta ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em neosporose em vacas leiteiras com histórico de abortos.

A soroprevalência em vacas recém-paridas foi menor do que as suas progênes, havendo, possivelmente, influências da imunossupressão durante o parto.

Há diferenças na expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 entre vacas e bezerras soropositivas ao *Neospora caninum* em relação às soronegativas. A expressão gênica do IFN- $\gamma$  e da IL-10 é menor nas vacas e bezerras soropositivas em relação às soronegativas.