

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INFECÇÃO ORAL DE NEONATOS DE GERBILS
(*Meriones unguiculatus*) COM TAQUIZOÍTOS DE
*Neospora caninum***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maiara Sanitá Tafner Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**INFECÇÃO ORAL DE NEONATOS DE GERBIL (*Meriones unguiculatus*)
COM TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum***

por

Maiara Sanitá Tafner Ferreira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientadora: Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra.

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**INFECÇÃO ORAL DE NEONATOS DE GERBILS (*Meriones*
unguiculatus) COM TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum***

elaborada por

Maiara Sanitá Tafner Ferreira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXMINADORA:

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Larissa Picada Brum, Dra. (Unipampa – Dom Pedrito)

Irina Lubeck, Dra. (Unipampa – Uruguaiana)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar os meus caminhos e me dar forças para estar sempre seguindo em frente, mesmo diante das dificuldades que a vida nos traz.

Aos meus pais, Maida e Carlos Alberto, pelo amor e carinho de sempre, superando a distância, para que eu pudesse dar seguimento à minha especialização, contribuindo para minha carreira profissional.

Aos meus avós maternos, Mário e Léa, e à minha avó paterna, Maria Helena, por todo apoio, incentivo e dedicação, fazendo todo o possível para que eu pudesse realizar estes dois anos de mestrado. Sem eles não teria sido possível realizá-lo!

À minha irmã, Carolina, pelo incentivo nestes dois anos, sendo meu exemplo de todos os dias, me dando forças para seguir esta caminhada.

À minha orientadora, Fernanda Silveira Flores Vogel, pelos conhecimentos transmitidos, apoio, dedicação, exemplo e companheirismo de todos os dias ao longo desta jornada. Muito obrigada!

Aos professores, Luis Antônio Sangioni e Agueda Palmira Castagna de Vargas, meus co-orientadores, pelo auxílio sempre que necessário e pelos ensinamentos compartilhados.

A toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), pelo companheirismo, amizade, auxílio nas atividades realizadas, risadas e carinho, tornando meus dias sempre melhores e mais agradáveis!

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) pela oportunidade da realização do mestrado e a CAPES pelo fomento dessa pesquisa.

À secretária Maria do PPGMV pela eficiência e profissionalismo.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão do mestrado, muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

INFECÇÃO ORAL DE NEONATOS DE GERBILS (*Meriones unguiculatus*) COM TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum*.

AUTORA: MAIARA SANITÁ TAFNER FERREIRA

ORIENTADORA: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014.

Neosporose é uma enfermidade de origem parasitária, causada pelo protozoário *Neospora caninum* e caracteriza-se como uma das principais causas de aborto em bovinos. Eventualmente, é possível ocorrer o nascimento de animais com sinais neurológicos, natimortos, ou ainda, o nascimento de bezerros clinicamente normais, porém cronicamente infectados. Embora existam inúmeras pesquisas relacionadas à neosporose bovina, ainda existem imprecisões quanto ao ciclo e patogenia da infecção por *N. caninum*, para que possam ser determinadas estratégias adequadas ao controle e profilaxia da doença. Os gerbils (*Meriones unguiculatus*) são considerados altamente sensíveis a replicação do protozoário. Assim, este estudo teve como principal objetivo verificar a ocorrência de infecção pelo *N. caninum* através da inoculação oral de taquizoítos em gerbils. Foram inoculados 17 animais pela via oral, com 4×10^5 taquizoítos de *N. caninum*. A frequência de detecção total de DNA de *N. caninum* das amostras demonstrou que ocorre infectividade pelo protozoário através desta via de inoculação, observando que em 81,8% dos animais inoculados foi detectado DNA do parasita. Em relação aos tecidos, pode-se observar que o DNA do protozoário foi encontrado em todos os órgãos avaliados (coração, pulmões, rins, fígado, baço, cérebro), com frequências variáveis, demonstrando assim a ampla distribuição deste protozoário em diferentes tecidos dos animais.

Palavras-chave: neosporose, bovinos, modelos experimentais, técnicas moleculares.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

ORAL INFECTION OF NEONATES GERBILS (*Meriones unguiculatus*) WITH *Neospora caninum* TACHYZOITES

AUTHOR: MAIARA SANITÁ TAFNER FERREIRA

ADVISER: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL

Santa Maria, February, 27th, 2014.

Neosporosis is a parasite disease caused by *Neospora caninum* protozoan and characterized as a major cause of abortion in cattle. Eventually is possible birth of animals with neurological signs, stillbirths or birth of clinically normal calves, but chronically infected. Although there are many researches related to bovine neosporosis, there are still doubts about the cycle and the pathogenesis of *N. caninum* infection, so that is suitable for certain control and prophylaxis strategies to disease. Gerbils are considered highly sensitive of the parasite replication. Thus, this study aimed to verify the occurrence of infection with *N. caninum* by oral inoculation of tachyzoites in gerbils (*M. unguiculatus*). Seventeen animals were orally inoculated with 4×10^5 *N. caninum* tachyzoites. The detection frequency of total DNA samples of *N. caninum* showed that the protozoan infectivity occurs via this route of inoculation, noting that 81.8 % of the inoculated animal parasite DNA was detected. In relation to tissues, it can be observed that the DNA parasite was found in all organs evaluated (heart, lungs, kidneys, liver, spleen, brain), by variable frequency, demonstrating the wide distribution of this parasite in animals tissues.

Key words: neosporosis, cattle, experimental models, molecular techniques.

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

QUADRO 1. Frequência de detecção de DNA de <i>Neospora caninum</i> através da análise por PCR em amostras de tecidos de <i>Meriones unguiculatus</i> inoculados via oral com 4×10^5 taquizoítos.....	27
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2.CAPÍTULO I. INFECÇÃO ORAL DE NEONATOS DE GERBILS (<i>Meriones unguiculatus</i>) COM TAQUIZOÍTOS DE <i>Neospora caninum</i>.....	14
Abstract.....	14
Resumo.....	15
Introdução.....	16
Materiais e métodos.....	18
Comitê de ética e biossegurança.....	19
Resultados.....	19
Discussão.....	20
Conclusão.....	23
Referências.....	23
3.CONCLUSÕES.....	28
4.REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade causada pelo protozoário *Neospora caninum* e é responsável por causar aborto, sendo considerada uma das principais causas de perdas econômicas na indústria de laticínios e carne (LARSON et al., 2004). Na Austrália a perda econômica anual é estimada em aproximadamente 100 milhões de dólares (REICHEL & ELLIS, 2008).

O protozoário *N. caninum* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, família Sarcocystidae (DUBEY et al., 1988). Para completar o ciclo, necessita de dois hospedeiros, sendo um hospedeiro intermediário e um hospedeiro definitivo. Cães (MACLLISTER et al., 1998), coiotes (GONDIM et al., 2004) e dingos (KING et al., 2010) são classificados como hospedeiros definitivos, eliminando oocistos em suas fezes. Bovinos, pequenos ruminantes, búfalos, cavalos, cervídeos e também os cães, são conhecidos como hospedeiros intermediários, pela característica de apresentarem cistos com bradizoítos em diferentes tecidos (DUBEY, 1999). Ao consumirem tecidos de hospedeiros intermediários contendo a forma cística do parasita, os cães, coiotes e dingos, podem tornar-se infectados (LINDSAY, et al., 1999). Com isso, ocorre a reprodução sexuada do parasita no intestino do hospedeiro definitivo, havendo liberação de oocistos não esporulados em suas fezes. Entre 24-72 horas após serem eliminados no meio ambiente, ocorre a esporulação destes oocistos, constituindo-se de dois esporocistos, contendo quatro esporozoítos (McALLISTER, et al. 1998). O hospedeiro intermediário ingere alimentos contaminados com oocistos esporulados que através de ação mecânica e enzimática liberam os esporozoítos na luz intestinal e estes, invadem os tecidos e sofrem reprodução assexuada, originando os taquizoítos móveis. Os taquizoítos se multiplicam rapidamente podendo penetrar em diversas células do hospedeiro

(macrófagos, monócitos, neurônios, fibroblastos, endotélio vascular, miócitos, células tubulares renais e hepatócitos) causando severas lesões em diferentes órgãos (DUBEY, 1993). Alguns se transformam em bradizoítos, dentro de cistos, permanecendo latentes e em lenta divisão (LINDSAY, et al., 1999) sendo encontrados principalmente no SNC e retina, persistindo por vários anos, sem provocar manifestações clínicas (FUCHS, et al. 1998).

A transmissão em bovinos pode ocorrer de forma vertical ou horizontal, onde a transmissão horizontal ocorre através da ingestão de oocistos pela água e alimentos contaminados (DUBEY et al., 2007). A transmissão transplacentária ou vertical é altamente eficiente e é o principal modo de transmissão de *N. caninum* em bovinos (SCHARES et al. 1998). As vacas infectadas transmitem o *N. caninum* aos seus descendentes, durante a gestação, através da placenta, podendo causar infecção fetal e com isso levar ao aborto e desta forma, manter o nível de infecção em um rebanho (WILLIAMS et al., 2009).

A transmissão de *N. caninum* para o feto pode ser exógena, que ocorre após infecção primária de uma fêmea gestante, ou endógena, através de uma fêmea que adquiriu a infecção antes da gestação (possivelmente, uma fêmea com uma infecção crônica persistente) onde ocorreu reativação da infecção (TREES & WILLIAMS, 2005). A reativação da doença, em vacas prenhes, seguida por transmissão transplacentária, é uma importante via de propagação persistente de *N. caninum* para as gerações seguintes em um rebanho (HALL et al., 2005). Bezerros de vacas infectadas, embora nascidos clinicamente normais, tem até 90% de chance de serem carreadores da neosporose (DUBEY, 1999; PARÉ et al., 1996; WOUDA et al. 1998). As vacas permanecem infectadas por toda a vida e podem infectar seus descendentes em gestações consecutivas ou alternadas (FIORETTI et al., 2003), embora a taxa de infecção possa diminuir devido a um desenvolvimento de imunidade (DIJKSTRA et al., 2003).

Nos hospedeiros intermediários, a principal forma que causa a infecção aguda da neosporose são os taquizoítos. Estes são disseminados pela corrente sanguínea e sistema linfático, sendo capazes de induzir uma resposta imune e através da multiplicação ativa, podem romper células hospedeiras, levando à morte celular (DUBEY & DE LAHUNTA, 1993). Na fase inicial da infecção, os taquizoítos modulam funções na célula hospedeira fornecendo oportunidade para a doença se manifestar (BOOTHROYD & DUBREMETZ, 2008). Posteriormente, os taquizoítos se tornam alvo de destruição pelo sistema imune e sua capacidade para estabelecer ou prolongar a doença é diminuída (ELLIS et al., 2010;. INNES et al., 2002;. QUINN et al., 2004), sendo assim, os taquizoítos podem se diferenciar em bradizoítos, devido a resposta imunológica (MILLER et al., 2009).

Sugere-se que os fetos possam ingerir taquizoítos pelo fluido amniótico e bezerros recém-nascidos através do colostro (DUBEY & SHARMA, 2003; ROMERO & FRANKENA, 2003; HOBSON et al., 2005). Por meio de infecção experimental foi comprovada a transmissão do *N. caninum* pela via lactogênica em bezerros, sendo um indicativo de que as fases assexuadas do parasita também podem causar infecção (UGGLA et al., 1998). Estudos realizados com *Toxoplasma gondii* confirmam que o protozoário pode sobreviver no leite por cerca de 5 dias e acredita-se que os taquizoítos presentes no leite são incapazes de sobreviverem aos sucos gástricos ao passarem pelo estômago (SACKS et al., 1982). Porém, o trato digestório dos recém-nascidos apresenta produção de ácido clorídrico e enzimas em níveis baixos (ROY, 1990; TIZARD, 1996) com atividade proteolítica sendo minimizada por inibidores de tripsina presentes no colostro (JOHNSON, 1997). Estas condições no aparelho digestivo do recém-nascido permitem que o *N. caninum* mantenha seu potencial de infecção se o colostro for ingerido logo após o nascimento dos animais (UGGLA et al., 1998).

A maioria dos estudos realizados através de infecção experimental de *N. caninum* é realizada através das vias intraperitoneais e subcutâneas, a fim de estabelecer a infecção

(NISHKAWA et al., 2001; TANAKA et al., 2000). A utilização exclusiva de bovinos em estudos é dispendiosa e devido a isto, cada vez mais buscam-se alternativas de estudos com animais de laboratório ou modelos experimentais que assemelham estas condições, como a utilização de roedores em estudos experimentais (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006). Para tal, devem-se utilizar animais que sejam capazes de se infectar, produzir resposta imunológica e revelar as manifestações clínicas da doença.

Gerbils (*Meriones unguiculatus*) têm demonstrado ser uma alternativa nos estudos de neosporose. Essa espécie de roedor é considerada altamente sensível a replicação do protozoário sem imunossupressão prévia (GONDIM et al., 2001). Estes animais podem fornecer respostas a situações desconhecidas nos bovinos e são utilizados para reproduzir condições semelhantes as que ocorrem nesta espécie, como: formação de cistos teciduais no cérebro, avaliação de parâmetros imunológicos, comparação da carga parasitária, lesões e respostas a citocinas inflamatórias (KHAN et al., 1997; EPERON et al., 1999). A maioria dos tecidos desse roedor são suscetíveis à invasão pelo protozoário e desenvolvem resposta imunológica satisfatória, com características excelentes, mimetizando a infecção que ocorre em bovinos (GONDIM et al., 2001).

DUBEY & LINDSAY (2000) demonstraram que os gerbils são altamente suscetíveis a neosporose quando inoculados via oral com oocistos de *N. caninum*. Outros autores demonstram que eles também são suscetíveis a infecções induzidas com taquizoítos de *N. caninum* (GONDIM et al., 1999; 2001) e cistos teciduais (DUBEY et al., 2004). Estes animais vêm sendo utilizados como modelos experimentais de neosporose aguda, através da inoculação intraperitoneal de diferentes concentrações de taquizoítos (LINDSAY et al., 2005). Apesar disso, poucos são os dados a respeito da distribuição do parasita nos órgãos do hospedeiro infectado e da compreensão sobre as respostas dos gerbils frente à infecção por *N. caninum*. O entendimento das respostas dos gerbils frente a neosporose, é de grande

importância para o desenvolvimento de formas de prevenção ou possíveis tratamentos da infecção (KANG et al., 2009).

Pouco se sabe sobre a evolução clínica da neosporose, pela ingestão de taquizoítos de *N. caninum* por via oral, bem como o entendimento sobre as respostas dos gerbils frente à infecção por este protozoário, com caracterização dos sítios de replicação do protozoário em diferentes órgãos destes animais. Desta forma, este estudo foi realizado com a finalidade de melhor esclarecer a fase aguda da neosporose em gerbils neonatos, a partir da infecção experimental com taquizoítos de *N. caninum* (cepa Nc-1) por via oral, utilizando PCR para detecção de DNA do protozoário em diferentes órgãos e tecidos dos animais infectados experimentalmente.

2. CAPÍTULO I

Infecção oral de neonatos de gerbils (*Meriones unguiculatus*) com taquizoítos de *Neospora caninum*¹

Maiara S.T. Ferreira^{2*}, Fernanda S.F. Vogel², Luis A. Sangioni², Augusto Weber², Patricia Braunig² e Marcos A.B. Vaz³

(Artigo submetido à revista científica Pesquisa Veterinária Brasileira, 2013, A2)

ABSTRACT.- Ferreira M.S.T., Vogel F.S.F., Sangioni L.A., Weber A., Braunig P. & Vaz M.A.B. 2013. [**Oral infection of neonates gerbils (*Meriones unguiculatus*) with *Neospora caninum* tachyzoites.**] Infecção oral de neonatos de gerbils (*Meriones unguiculatus*) com taquizoítos de *Neospora caninum*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: labdpufsm@gmail.com

Neosporosis is a disease caused by the protozoan parasite *Neospora caninum* and is a major cause of reproductive disorders in cattle; it is able to determine large economic losses. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are used in many cases as an experimental model because they are highly susceptible to replication of *N. caninum*. So the objectives of this study were to evaluate the susceptibility of neonates gerbils to oral infection with *N. caninum* tachyzoites

¹ Recebido em 12 de setembro de 2013.

Aceito para publicação em

² Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, prédio 44, sala 5149, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: matafner@hotmail.com

³ Departamento de Estatística, Centro de Ciências Naturais e Exatas, prédio 13, sala 1208, UFSM, Santa Maria, RS.

(strain NC-1) in relation to the clinical course and distribution of tachyzoites in different organs and tissues by PCR for detection the parasite DNA. We used 18 gerbils, 4-5 days of age, of which 17 animals were orally inoculated with 4×10^5 tachyzoites of *N. caninum*. The *N. caninum* DNA detection frequency from samples showed that the infection happens via the protozoan oral inoculation. The parasite DNA was detected in 100% of inoculated animals. In relation to tissues, the DNA of the parasite was found in all organs evaluated (heart, lungs, kidneys, liver, spleen and brain) with variable frequencies, thus demonstrating the wide distribution of the protozoa in different tissues of the animal.

INDEX TERMS: molecular techniques; experimental models; cattle; protozoan.

RESUMO.- Neosporose é uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário *Neospora caninum* e caracteriza-se como uma das principais causas de desordens reprodutivas no rebanho bovino, capaz de determinar grandes prejuízos econômicos. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) são altamente sensíveis a replicação do protozoário *N. caninum*, em muitos casos como modelo experimental. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a susceptibilidade de gerbils neonatos à infecção com taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1) pela via oral e estudar a neosporose no que diz respeito à evolução clínica da doença e distribuição dos taquizoítos em diversos órgãos e tecidos utilizando PCR para detecção do DNA do protozoário. Foram utilizados 18 gerbils, com idade de 4-5 dias, sendo que destes, 17 animais foram inoculados pela via oral com 4×10^5 taquizoítos de *N. caninum*. A frequência de detecção total de DNA de *N. caninum* das amostras demonstrou que ocorre infectividade pelo protozoário através da via de inoculação oral, observando que em 100% dos animais inoculados foi detectado DNA do parasita. Em relação aos tecidos, pode-se observar que o DNA do protozoário foi encontrado em todos os órgãos avaliados (coração, pulmões, rins,

fígado, baço e cérebro), com frequências variáveis, demonstrando assim a ampla distribuição deste protozoário pelos diferentes tecidos do animal.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: técnicas moleculares; modelos experimentais; bovinos; protozoário.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário cosmopolita pertencente ao filo apicomplexa (Dubey 2003). A neosporose pode causar doenças reprodutivas, desde mortalidade embrionária ao nascimento de bezerros fracos, passando por abortos, mumificação fetal e natimortalidade, com grandes prejuízos, principalmente em rebanhos leiteiros. Em muitos casos, pode ocorrer o nascimento de bezerros clinicamente normais ou com sinais neurológicos, e com comprovação sorológica e histopatológica de infecção congênita, demonstrando que nem sempre a infecção induz o aborto (Barr et al. 1993, Dubey et al. 2006). Há duas formas de transmissão do agente: a transmissão vertical, na qual fêmeas infectadas cronicamente transmitem o protozoário via transplacentária para a progênie (Schaes et al. 1998) e a transmissão horizontal, que ocorre principalmente através da ingestão de oocistos esporulados de *N. caninum* no meio ambiente (Gondim et al. 2004).

Em infecções experimentais por *N. caninum* os taquizoítos podem ser utilizados, por serem mais fáceis de recuperar em relação aos oocistos, que são eliminados em quantidades baixas juntamente com as fezes (Ramamoorthy et al. 2005). A realização de experimentos com roedores ainda parece ser a melhor alternativa para o estudo destas características patogênicas e epidemiológicas, pois com *N. caninum*, o custo e o tempo de obtenção de resultados satisfatórios em bovinos e cães, prejudicam e dificultam a coleta e análise dos dados. Além disso, estes roedores são importantes para caracterizar e comparar a virulência de

isolados de campo (Quinn et al. 2002), ou ainda, estudos no desenvolvimento de vacinas e testes de medicamentos para o controle e tratamento da neosporose.

Gerbils (*Meriones unguiculatus*) são utilizados como modelo experimental para mimetizar a infecção dos bovinos, já que são considerados altamente sensíveis a replicação do protozoário sem imunossupressão prévia (Gondim et al. 2001) demonstrando alta sensibilidade a neosporose aguda, através da infecção com oocistos do *N. caninum* pela via oral (Dubey & Lindsay 2000). Além disso, Gondim et al. (2001) revelaram que os gerbils são sensíveis à inoculação de taquizoítos de *N. caninum* pela via parenteral. No entanto, a susceptibilidade destes modelos experimentais à inoculação de *N. caninum* na forma de taquizoítos pela via oral não havia sido demonstrada. Estudos da patogenia da neosporose em gerbils são de grande importância para o desenvolvimento de formas de intervenção na prevenção (vacinação) ou possíveis tratamentos (quimioterápicos) para a doença em animais domésticos como bovinos e cães (Kang et al. 2009).

Pesquisas sugerem que fetos possam ingerir taquizoítos pelo fluido amniótico e bezerros recém-nascidos pelo colostro, sobretudo nas primeiras horas de vida (Dubey & Sharma 2003, Romero & Frankena 2003, Hobson et al. 2005). Experimentalmente, bezerros foram infectados através da ingestão de leite e colostro contaminados com taquizoítos onde foi comprovada esta via de infecção (Uggla et al. 1998, Davison et al. 2001, Moskwa et al. 2007).

Os objetivos deste estudo foram: 1) verificar o potencial de transmissão via oral de *N. caninum* na forma de taquizoítos em neonatos de *M. unguiculatus*; e 2) caracterizar os tecidos preferencialmente utilizados para replicação do parasita através da PCR, para que desta forma, possam ser estabelecidos modelos experimentais úteis ao estudo desta doença e seu controle e profilaxia em animais domésticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de antígeno. Para a obtenção do antígeno, taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* foram mantidos em cultivo de células Vero para multiplicação, a 37°C em meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos em estufa a 5% de CO₂. Para a preparação do inóculo, a suspensão do cultivo celular contendo taquizoítos e restos celulares foi submetido à decantação durante 30 minutos a 4°C em tubo de ensaio. O sobrenadante obtido foi lavado em meio RPMI 1640 e centrifugado para concentração dos taquizoítos, os quais foram contados em câmaras de *neubauer* para obtenção da concentração desejada.

Animais. Foram utilizados 18 gerbils (*Meriones unguiculatus*) com idades entre 4 e 5 dias, do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram mantidos em ambiente climatizado e alocados em caixas próprias para roedores com água e ração *ad libitum*.

Inoculação dos animais. Os animais foram obtidos a partir de três ninhadas diferentes e inoculados por via oral com concentração de taquizoítos de 4×10^5 . Os taquizoítos foram diluídos em 10 µL de solução salina e administrados por via oral. Como controle um animal não foi inoculado constituindo o controle negativo, sendo mantido nas mesmas condições (Quadro 1).

Monitoramento da infecção. Durante o experimento os animais foram diariamente avaliados quanto à presença de sinais clínicos como: inclinação lateral da cabeça, pelos arrepiados, anorexia, aumento de volume abdominal (sinais clínicos da neosporose aguda) (Aguado-Martínez et al., 2009).

Coleta de tecidos. Após a morte espontânea dos animais inoculados e eutanásia do animal controle negativo, foram coletados os seguintes tecidos de todos os animais: Sistema Nervoso Central (SNC), fígado, baço, rins, pulmão e coração. Os tecidos foram submetidos à lavagem

com solução de PBS estéril e acondicionados em microtubos *ependorff* à -20°C até a realização da extração de DNA.

Extração de DNA. A extração de DNA foi realizada com *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega™, Madison, USA) conforme protocolo do fabricante. As amostras foram estocadas a temperatura de -20°C até a realização dos testes. A concentração do DNA foi avaliada em um picodrop com absorvância de 260nm (Cambridge, USA).

Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). A técnica de PCR foi realizada utilizando *primers* específicos para uma seqüência do gene Nc5 do *N. caninum*, (*forward primer* (Np21): CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC e *reverse primer* (Np6) CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT) (Yamage et al. 1996). O produto final da amplificação da reação, com peso molecular de 328pb, foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com *SYBR® safe DNA gel stain* (Invitrogen™, USA) e visualizado em luz ultravioleta. O DNA extraído de cultivo de células Vero infectadas com taquizoítos de *N. caninum* foi utilizado como controle positivo para as reações de PCR convencional.

Análise estatística. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk* ao nível de 5% de significância. Como não foi verificado normalidade dos dados, foi utilizado o teste não-paramétrico *Wilcoxon-Mann-Whitney* com nível de significância de 5% para comparação do total de tecidos positivos comparando a frequência de detecção de DNA para cada tecido.

Comitê de Ética e Biossegurança. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), número do parecer: 052/2012.

RESULTADOS

A infecção oral em gerbils infectados experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum* foi demonstrada pela detecção de DNA do protozoário em diferentes tecidos (Quadro 1). Em todos os animais inoculados com taquizoítos de *N. caninum*, por via oral, foi observada a presença de sinais clínicos. O aparecimento dos sinais clínicos variou entre 5 e 17 dias. Os sinais observados foram anorexia e redução na condição corporal.

O início do período de mortalidade pós-infecção variou entre 8-17 dias, sendo que, o animal do grupo controle permaneceu clinicamente saudável até o término do período de avaliação do experimento. No momento da necropsia, rins e fígado encontravam-se aumentados de volume em todos os animais inoculados quando comparados ao animal controle negativo. Além destes dados, foi observado pulmões hemorrágicos em alguns animais inoculados.

Neste experimento, o DNA de *N. caninum* foi detectado em 100 % dos animais inoculados (Quadro 1). Para o baço e o coração, a frequência de positivos na PCR, foi de 15/17 (88,2%). Nos pulmões 11/17 (64,7%); nos rins, 10/17 (58,8%), no SNC, em 8/17 (47%) e no fígado 6/17 (35,3%), foram detectados DNA de *N. caninum*. O critério para determinar a distribuição tecidual ou invasão do parasita foi baseado na presença de DNA do protozoário através da PCR (Quadro 1). No animal controle, a reação de PCR foi negativa em todos os órgãos examinados.

DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo estão de acordo com estudos prévios realizados em gerbils, que demonstraram a alta suscetibilidade desses animais pela infecção com *N. caninum* (Dubey & Lindsay, 2000, Ramamoorthy et al., 2005). Em relação à patologia, onde observamos rins e fígado aumentados de volume, dados semelhantes foram também observados por Toscan et al. (2012).

Em estudo realizado por Uggla et. al (1998) quatro bezerros foram inoculados oralmente com colostro contendo aproximadamente de 3 a 10×10^7 taquizoítos de *N. caninum*, em até 6 horas após o nascimento. Dois dos bezerros foram inoculados via sonda gástrica e dois dos animais por garrafas. Os dois animais que receberam colostro através de garrafas contendo taquizoítos apresentaram soroconversão e foi detectado DNA por PCR do *N. caninum* no SNC. Estes dados sugerem que a infecção oral com colostro pode ser uma possível rota de transmissão em bezerros recém-nascidos. Acredita-se que os taquizoítos presentes no leite não são capazes de sobreviver ao suco gástrico quando ocorre a passagem através do estômago (Dubey, 1980). Porém, no trato digestivo de recém-nascidos a produção de ácido clorídrico e enzimas é baixa e a atividade proteolítica é minimizada pela ação de inibidores de tripsina presentes no colostro (Roy 1990, Tizard 1996).

Similarmente, Davison et al. (2001) realizou três experimentos para verificar a transmissão de *N. caninum*. Em seu primeiro experimento, seis bezerros receberam garrafas de colostro ou leite contendo aproximadamente 10^7 taquizoítos, em até 12 horas após o nascimento e mais três ocasiões em intervalos semanais. No segundo experimento, dois bezerros com menos de 12 horas foram alimentados com tecidos placentários de bovinos naturalmente infectados com *N. caninum*; e no terceiro experimento, sete bezerros (1-3 dias de idade) foram amamentados por vacas soropositivas em lactação, durante 12 semanas. Foram observados que os animais do primeiro experimento soroconverteram. No terceiro experimento, apenas um animal soroconverteu.

Os resultados do presente estudo, associados a dados dos artigos supracitados confirmam que a infecção oral através da ingestão de taquizoítos pode ser uma via de transmissão em animais neonatos. Dessa forma é provável que, em algumas situações, os bezerros possam se infectar por esta via, caso um grande número de taquizoítos estiver presente no colostro ou no leite de uma vaca (Davison et al., 2001). Nos trabalhos em

bovinos, a dose de taquizoítos inoculados por via oral foi relativamente alta (em torno de 10^7). Em gerbils foi determinado a ocorrência de infecção oral na concentração de 4×10^5 , porém, mais estudos precisam ser desenvolvidos para determinar a importância desta forma de transmissão bem como qual a concentração de taquizoítos no colostro de vacas infectadas pelo *N. caninum* seria capaz de transmitir essa infecção.

Observando a alta frequência de detecção de DNA de *N. caninum* entre os animais inoculados, pode-se assegurar que após inoculação por via oral ocorreu eficiente replicação do protozoário e que o mesmo distribuiu-se por diferentes tecidos dos roedores. Analisando os tecidos separadamente, constatou-se que os dados demonstrados na presente pesquisa concordam com López-Pérez et al. (2006) e Toscan et al. (2012), que detectaram no pulmão, coração, baço e rins, taquizoítos de *N. caninum*, na fase aguda da infecção, atribuindo estes resultados à afinidade do agente aos tecidos para replicação nos primeiros dias pós-infecção. Portanto, sugere-se que, em roedores os tecidos que devem preferencialmente ser coletados para o diagnóstico são estes descritos anteriormente.

Em relação a distribuição tecidual, um estudo realizado por Kang et al. (2009), revelou que os primeiros órgãos-alvo da infecção aguda *N. caninum* foram o fígado, baço e rim e que o cérebro foi o último órgão a ser invadido pelo parasita, onde a tendência de invasão tecidual pelo *N. caninum* foi fígado/baço/rim > coração/músculo/medula espinhal/sangue > pulmão > cérebro. Toscan et al. (2012) relata que a tendência de invasão e distribuição tecidual de *N. caninum*, foram rim > pulmão > baço/coração > fígado > cérebro > medula. Os resultados apresentados neste estudo diferem dos resultados apresentados por Kang et al. (2009) e Toscan et al. (2012). Este fato pode estar relacionado à idade dos animais, onde pelos resultados obtidos poderíamos sugerir a maior susceptibilidade de neonatos à infecção pelo *N. caninum*, onde observamos uma distribuição tecidual pelo protozoário em coração=baço > pulmão > rins > cérebro > fígado.

Considerando a idade dos animais, sugere-se que este é um fator contribuinte para produzir a infecção, pois provavelmente torna os animais mais susceptíveis a doença. Assim, a inoculação por via oral em modelos experimentais, na concentração de 4×10^5 , é capaz de produzir a infecção por *N. caninum*.

Porém ainda restam algumas dúvidas a serem esclarecidas, de como a infecção através da via oral com colostro ocorre em bovinos, também, qual seria a concentração ideal necessária de taquizoítos no colostro/leite para veicular a infecção por via oral. Portanto, são necessárias maiores investigações a fim de confirmar a transmissão de neosporose através do colostro de vacas infectadas aos animais recém-nascidos.

CONCLUSÃO

A infecção oral de neonatos de gerbils, com taquizoítos de *N. caninum*, na concentração de 4×10^5 , é um método possível de transmissão experimental da enfermidade, causando neosporose aguda nos mesmos, bem como é possível detectar DNA do protozoário em diferentes tecidos dos animais inoculados.

REFERÊNCIAS

- Aguado-Martínez A., Ortega-Mora L.M., Alvarez-García G., Rodríguez-Marco S., Risco-Castillo V., Marugán-Hernández V. & Fernández-García A. 2009. Stage-specific expression of NcSAG4 as a marker of chronic *Neospora caninum* infection in a mouse model. J. Parasitol. 136:757-764.
- Barr B.C., Conrad P.A. & Breitmeyer R. 1993. Congenital *Neospora caninum* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora* infected fetuses: four cases (1990-1992). J. Am. Med. Assoc. 202:113-117.

- Davison H.C., Guy C.S., McGarry J.W., Guy F., Williams D.J., Kelly D.F. & Trees A.J. 2001. Experimental studies on at the transmission of *Neospora caninum* between cattle. Res. Vet. Sci. 70:163-168.
- Dubey J.P. 1980. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. J. Am. Med. Assoc. 177:1203-1207.
- Dubey J. P. & Lindsay D.S. 2000. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. Parasitol. Res. 86:165-168.
- Dubey J.P. 2003. Neosporosis in cattle. J. Parasitol. 89:42-56.
- Dubey J. P. & Sharma S. P. 2003. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. Am. J. Vet. Res. 41:1-16.
- Dubey JP, Buxton D., Wouda W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. J. Comp. Pathol. 134:267–289.
- Gondim L.F., Pinheiro A.M., Santos P.O., Jesus E.E., Ribeiro M.B., Fernandes H.S., Almeida M.A., Freire S.M., Meyer R. & McAllister M.M. 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. V. Parasitol. 101:1–7.
- Gondim L.F., McAllister M.M., Anderson-Sprecher R.C., Björkman C., Lock T.F., Firkins L.D., Gao L. & Fischer W.R. 2004. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. Int. J. Parasitol. 90:1394-1400.
- Hobson J.C., Duffield T.F., Kelton D., Lissemore K., Hietala S.K., Leslie K.E., McEwen B. & Peregrine A.S. 2005. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. V. Parasitol. 127:177-188.

- Kang S.W., Park S.S., Choe S.E., Jean Y.H., Jung S.C., Kim K. & Quyen D.V. 2009. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. *Parasitol. Res.* 104:1262-1268.
- López-Pérez I.C., Risco-Castillo V., Collantes-Fernández E. & Ortega-Mora LM. 2006. Comparative effect of *Neospora caninum* infection in balb/c mice at three different gestation periods. *J. Parasitol.* 92:1286-1291.
- Moskwa B., Pastusiak K., Bien J. & Cabaj W. 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol. Res.* 100:633-636.
- Quinn H.E., Miller C.M., Ryce C., Windsor P.A. & Ellis J.T. 2002. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *J. Parasitol.* 88:691-696.
- Ramamoorthy S., Sriranganathan N. & Lindsay D.S. 2005. Gerbil model of acute neosporosis. *V. Parasitol.* 127:111-114.
- Romero J. J. & Frankena K. 2003. The effect of the dam relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rica dairy farms. *V. Parasitol.* 114:159-171.
- Roy J.H.B. 1990. *The Calf*. 5 ed. Vol.1. Management of Health. Butterworths, Boston, MA. Butterworth Publishers Inc. 258p.
- Schares G., Peters M., Wurm R., Bärwald A. & Conraths F.J. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *V. Parasitol.* 80:87-98.
- Tizard I. 1996. *An Introduction to Veterinary Immunology*. W.B. Saunders, Philadelphia. 242-243.
- Toscan G., Camillo G., Weber A., de Oliveira C.S., Gonçalves P.B.D, Sangioni, L.A. & Vogel F.S.F. 2012. Detecção de ácidos nucleicos em tecidos de gerbils submetidos à infecção aguda por *Neospora caninum*. *Ciência Rural* 42:1865-1872.

- Ugglå A., Stenlund S., Holmdahl O.J., Jakubek E.B., Thebo P., Kindahl H. & Björkman C. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 28:1467-1472.
- Yamage M., Flechtner O. & Gottstein B. 1996. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.* 82:272-279.

Quadro 1. Frequência de detecção de DNA de *Neospora caninum* através da análise por PCR em amostras de tecidos de *Meriones unguiculatus* inoculados via oral com 4×10^5 taquizoítos

Animais	Coração	Pulmão	Baço	Rim	Fígado	Cérebro
1	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+
5	+	-	+	-	+	+
6	+	+	+	-	+	-
7	+	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	-	-
9	+	+	+	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-
12	-	-	+	-	-	-
13	+	+	+	+	-	+
14	+	+	+	+	-	+
15	+	+	+	+	-	+
16	+	+	+	+	-	+
17	+	+	+	+	-	+
C(-)*	-	-	-	-	-	-
Total	15/17	11/17	15/17	10/17	6/17	8/17
(%)	(88,2)	(64,7)	(88,2)	(58,8)	(35,3)	(47)

* C(-): controle negativo.

3. CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo foi possível determinar:

1. Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que é possível ocorrer a infecção oral de *Neospora caninum*, através do colostro, em bovinos recém-nascidos, uma vez que foi detectado DNA do protozoário em tecidos de neonatos de *Meriones unguiculatus*.
2. Gerbils podem ser utilizados como modelo experimental da infecção por via oral por *Neospora caninum*.
3. Ocorreu eficiente replicação do protozoário após inoculação via oral, onde o mesmo distribuiu-se por diferentes tecidos dos roedores.
4. Pode-se afirmar que a idade dos animais é um fator contribuinte para produzir a infecção, pois provavelmente torna os animais com uma susceptibilidade maior à doença.
5. A infecção oral de neonatos de gerbils, com taquizoítos de *Neospora caninum*, na concentração de 4×10^5 , é um possível método de transmissão da enfermidade, causando neosporose aguda nos mesmos.

4. REFERÊNCIAS

BOOTHROYD, J.C., DUBREMETZ, J.F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p.79–88. 2008.

COLLANTES-FERNÁNDEZ E., et al., Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**. v.142, p.187-191, 2006.

DIJKSTRA, T., et al. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v.110, p.161–169. 2003.

DUBEY, J.P., et al. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p.1269-1285. 1988.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other cystforming coccidia of humans and animals. In: KREIER, J. P. **Parasitic protozoa**. New York. Academic Press, p.1-158. 1993.

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

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Research**, v. 86, p.165–168. 2000.

DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J.P., et al. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**. v. 34, p.1157-1167. 2004.

ELLIS, J., et al. Microarray analyses of mouse responses to infection by *Neospora caninum* identifies disease associated cellular pathways in the host response. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.174, p.117–127. 2010.

EPERON, S. et al. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**. v. 21, p. 225–236, 1999.

FIORETTI, D.P., et al. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.50, p.399–404. 2003.

FUCHS, N., et al. Differential expression of cell surface-and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. **Journal of Parasitology**, v.84, p.753-758, 1998.

GONDIM L.F.P., et al. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **New Zealand Veterinary Journal**, v.47, p.36–36. 1999.

GONDIM, L.F.P., et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**. v.101, p.1–7. 2001.

GONDIM, L.F.P. et. al. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. **International Journal for Parasitology**. v.90, p.1394–1400. 2004.

HALL, C.A. et al. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.231–241. 2005.

HOBSON, J. C. et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 177-188, 2005.

INNES, E.A., et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, p.497–504. 2002.

JOHNSON, A. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitology Today**. v.13, p.393-397. 1997.

KANG, S.W, et al. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. **Parasitology Research**, v.104, p.1262-1268. 2009.

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

KING, J.S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 40, p.945-950, 2010.

LARSON, R.L. et al. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. **Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, p.1597–1604.2004.

LINDSAY, D.S., et al.. *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. **Compendium**, v.21, p.317-321, 1999.

LINDSAY, D.S., et al. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. **Journal of Parasitology**. v. 81, p.313-315. 2005.

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

MILLER, C.M., et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.23–39. 2009.

NISHIKAWA, Y., et al. A role for balance of interferon- γ and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v.116, p. 175–184. 2003.

PARÉ, J., et al. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire**, v.60, p.133–139. 1996.

QUINN, H.E., et al. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.723–732. 2004.

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

ROMERO, J. J.; FRANKENA, K. The effect of the dam relationship on serostatus to *Neospora Caninum* on 20 Costa Rica dairy farms. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 159-171, 2003.

SACKS, J.J., et al. Toxoplasmosis infection associated with raw goats milk. **Journal of the American Medical Association**. v. 248, p. 1728-1732. 1982.

SCHARES, G. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.87–98. 1998.

TANAKA, T., et al. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**. v.90, p.183– 191. 2000.

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

UGGLA, A., et al. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1467-1472, 1998.

WILLIAMS, D.J.L., et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v.136, p.1895–1900. 2009.

WOUDA, W., et al. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v.49, p.1311–1316. 1998.