

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

**DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (DNA) DE
Neospora caninum EM TECIDOS DE GERBILS
(*Meriones unguiculatus*) SUBMETIDOS À
INFECÇÃO AGUDA E CRÔNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gustavo Toscan

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (DNA) DE *Neospora caninum*
EM TECIDOS DE GERBILS (*Meriones unguiculatus*) SUBMETIDOS
À INFECÇÃO AGUDA E CRÔNICA**

por

Gustavo Toscan

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**

Orientador: Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2012

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

**DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS (DNA) DE *Neospora caninum* EM
TECIDOS DE GERBILS (*Meriones unguiculatus*) SUBMETIDOS À INFECÇÃO
AGUDA E CRÔNICA**

elaborada por

Gustavo Toscan

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

Comissão Examinadora:

Agueda Palmira Castagna de Vargas, Dr. (UFSM)
(Presidente)

Luis Antônio Sangioni, Dr. (UFSM)

Larissa Picada Brum, Dr. (Unipampa-Dom Pedrito)

Santa Maria, 29 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, a Nossa Senhora Aparecida pela oportunidade, pela saúde e força, na busca de cada vez mais atingir os meus ideais.

Aos meus familiares, meu pai Gelavir e minha mãe Salete Toscan, pelo amor e confiança, pela dedicação e carinho incondicional e, sobretudo, o apoio em todas as etapas da minha vida.

Aos meus irmãos Ângelo e Angelisa, pela alegria, incentivo, afeição e sinceridade sempre resgatados a qualquer momento. Ao meu inseparável e fiel cão Cuca, que me acompanhou por este período, passou pelo meu caminho e deixou sua marca.

À minha namorada Roberta, por todo o amor e carinho sempre compartilhados, pelo incentivo e companheirismo de todos os dias, por desejar meu sucesso e se dedicar a ele ao meu lado continuamente a cada desafio.

À Sra. Neyt, pela amizade e confiança, pelas palavras e dedicação sempre em qualquer ocasião.

À orientadora Dra. Fernanda Silveira Flores Vogel, pelos ensinamentos e amizade compartilhados, pelas cobranças sinceras, pelo exemplo de profissionalismo, pela atenção destinada na condução dos trabalhos.

Ao professor Dr. Luis Antônio Sangioni, pela convivência, ensinamentos e extraordinário companheirismo demonstrados durante o trabalho no Laboratório de Doenças Parasitárias.

Ao apoio e solicitude de todos os profissionais e alunos do laboratório de Bacteriologia (Labac) e biotecnologia da reprodução animal (BioRep), em especial a professora Dra. Agueda Palmira Castagna de Vargas e ao Dr. Gabriel Ribas Pereira.

À toda a equipe do do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFSM, pelos bons e alegres momentos que compartilhamos e excelente ambiente de cooperação, pelos erros e acertos no decorrer da caminhada, pelo apoio e dedicação no período de trabalho em todas as etapas deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pela oportunidade e estrutura oferecidas para a realização deste trabalho.

Às agências Financiadoras CAPES e CNPq, que apoiaram neste projeto.

RESUMO

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

DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (DNA) DE *Neospora caninum* EM TECIDOS DE GERBILS (*Meriones unguiculatus*) SUBMETIDOS À INFECÇÃO AGUDA E CRÔNICA

AUTOR: GUSTAVO TOSCAN

ORIENTADOR: FERNANDA SILVEIRA FLÔRES VOGEL

Santa Maria, 29 de fevereiro de 2012.

A neosporose é uma enfermidade de grande importância econômica, encontra-se distribuída em todo o mundo e pode ser considerada atualmente, umas das maiores causas de aborto e perdas neonatais em bovinos. A patogenia da infecção pelo *Neospora caninum* não está totalmente esclarecida e algumas questões a este respeito são importantes para determinar medidas mais eficientes de controle e profilaxia de um rebanho. A utilização exclusiva de bovinos nestes estudos é dispendiosa e demorada, com isso, algumas espécies de animais, como os roedores, podem ser utilizadas para torna-la possível. Os gerbils (*Meriones unguiculatus*) mimetizam a infecção em bovinos e são considerados altamente sensíveis a replicação do protozoário. Neste estudo foram avaliados as respostas destes modelos animais, em momentos de infecção diferentes, principalmente em relação a quantidade e severidade da infecção aguda e crônica/persistente pelo *N. caninum*. Além disso, a pesquisa esclarece os tecidos preferenciais de localização/replicação do protozoário nestes roedores em diferentes condições conforme a evolução da doença. Os resultados estão apresentados em dois artigos. No capítulo um, o objetivo foi caracterizar a infecção aguda pelo protozoário, a fim de determinar os principais sítios teciduais de replicação em modelos experimentais de *M. unguiculatus*. Desta forma conseguimos demonstrar que, inicialmente o protozoário fez uma replicação, mas que há uma distribuição em praticamente todos os tecidos do hospedeiro. Além disso, foi possível observar que sem uma atuação efetiva do sistema imune no combate ao agente, esta infecção evolui para a morte dos animais com sinais característicos rapidamente detectados, entre 3 a 5 dias após o início da infecção. Já o segundo capítulo, buscou estabelecer em roedores (*M. unguiculatus*) cronicamente infectados, quais os locais onde preferencialmente o *N. caninum* desenvolve a sua forma evolutiva crônica de bradizoitos que são características de uma etapa persistente da doença, principalmente em regiões do SNC. Além disso,

observamos que a dose inoculada interfere significativamente na indução de infecção aguda e crônica e isso se reflete na quantidade de detecção de ácidos nucleicos nos diferentes tecidos, sobretudo no SNC. Neste contexto, foi possível observar que o aparecimento de sinais clínicos foram mais brandos sem a indução de infecções letais e severas na maioria dos animais cronicamente infectados. Assim, através desse estudo podemos concluir que são necessárias técnicas altamente sensíveis para detectar ácidos nucleicos do *N. caninum*, especialmente em tecidos do SNC em animais infectados cronicamente.

Palavras-chave: *N. caninum*, distribuição tecidual, infecção, gerbils.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

DETECTION OF NUCLEIC ACIDS (DNA) OF *Neospora caninum* IN TISSUES OF GERBILS (*Meriones unguiculatus*) SUBMITTED TO ACUTE AND CHRONIC INFECTIONS

AUTHOR: GUSTAVO TOSCAN

ADVISER: FERNANDA SILVEIRA FLÔRES VOGEL

Santa Maria, February, 29th, 2012.

The neosporosis is a disease of great economic importance, is distributed worldwide and is considered today one of the major causes of abortion and neonatal deaths in cattle. The pathogenesis of *Neospora caninum* infection is not fully understood and some issues in this regard are important in determining the most efficient measures of control and prophylaxis of a flock. The exclusive use of animals in these studies are expensive and time consuming so, some species of animals, such as, the rodents, can be used to make it possible. The gerbils (*Meriones unguiculatus*) mimic infection in cattle and are considered highly sensitive to replication of the protozoan. This study evaluated the responses of these animal models, at different moments of infection, especially in the amount and severity of acute and chronic/persistent infections by *N. caninum*. In addition, the research sheds light the tissues preferred location/replication the protozoan in these rodent at different conditions depending on disease progresses. The results are presented in two articles. In chapter one, the aim was to characterize the acute infection by the protozoan for to determine the major tissue sites of replication in experimental models of *M. unguiculatus*. Thus we have demonstrated that, initially the protozoan made a replication, but there is a distribution in virtually all tissues of the host. In addition, we observed that without an effective action of the immune system to combat agent, the infection progresses to death of animals with characteristic signs rapidly detected between 3 and 5 days after initiation of infection. The second chapter, sought to establish in rodents (*M. unguiculatus*) chronically infected, which places the *N. caninum* prefers to develops chronic evolutive form bradyzoites that are characteristic of a phase of persistent disease, especially in regions of the CNS. Furthermore, we note that the dose inoculated interfere significantly in the induction of acute and chronic infection and this is reflected in the amount of detection of nucleic acids in different tissues, above all in the CNS. In this context, it was observed that the emergence of

clinical signs was milder without the induction of severe and lethal infections in most chronically infected animals. Thus, through this study we can conclude that highly sensitive techniques are necessary to detect nucleic acids from *N. caninum*, especially in the CNS tissues in animals chronically infected.

Key words: *N. caninum*, tissue distribution, infections, gerbils.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

FIGURA 1: Imagem representativa do local de secção do cérebro de um Gerbil (*Meriones unguiculatus*) para a obtenção das regiões utilizada neste estudo.....47

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1. Detecção de ácidos nucléicos (DNA) do *Neospora caninum* pela técnica de PCR em amostras de tecidos de gerbil (*Meriones unguiculatus*) submetidos infecção aguda com inoculação de 5×10^6 taq/ml (Grupo 1) e 5×10^5 taq/ml (Grupo 2).....29

CAPÍTULO II

TABELA 1. Detecção de ácidos nucléicos (DNA) do *Neospora caninum* pela técnica de PCR em amostras de tecidos de gerbil (*Meriones unguiculatus*) submetidos infecção crônica/persistente com inoculação de 5×10^4 taq/ml (Grupo A); 5×10^3 taq/ml (Grupo B) e 5×10^2 taq/ml (Grupo C).....45

TABELA 2. Detecção de ácidos nucléicos (DNA) do *Neospora caninum* pela técnica de qRT-PCR em amostras SNC de gerbils (*Meriones unguiculatus*) submetidos infecção crônica/persistente.....46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. CAPÍTULO I. DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (DNA) DE <i>Neospora caninum</i> EM TECIDOS DE GERBILS SUBMETIDOS À INFECCÃO AGUDA.....	14
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Material e métodos.....	18
Resultados e Discussão.....	20
Conclusão.....	25
Comitê de ética e experimentação animal.....	25
Referências.....	26
3. CAPÍTULO II. DETECÇÃO DE DNA DO <i>Neospora caninum</i> DURANTE INFECCÃO CRÔNICA EM GERBILS.....	30
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e métodos.....	34
Resultados e Discussão.....	37
Comitê de ética e experimentação animal.....	42
Referências.....	42
4. CONCLUSÕES.....	48
5. REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório, agente causador de aborto em bovinos de todo o mundo (DUBEY & LINDSAY 1996) e reconhecida, atualmente, como uma importante enfermidade de caráter emergente (ANDERSON et al., 2000; DUBEY & SCHARES, 2006).

O ciclo evolutivo do protozoário é indireto e atualmente são descritos como hospedeiros definitivos os cães domésticos (MCALLISTER et al., 1998) e alguns selvagens como: coiotes (GONDIN et al., 2004), dingoes (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobos (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). Os hospedeiros definitivos são caracterizados por excretar oocistos do parasita nas fezes e que, após esporulados no meio ambiente são ingeridos pelos hospedeiros intermediários.

Além disso, diferentes espécies de mamíferos são descritos como hospedeiros intermediários desta protozoose, como os bovinos, eqüinos, felinos, ovinos, caprinos e cães, entretanto, o *N. caninum* determina grandes conseqüências principalmente relacionadas à reprodução na espécie bovina (DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2005).

Este protozoário apresenta um ciclo de vida, envolvendo três estágios infecciosos. Primeiro, os oocistos são excretados nas fezes de hospedeiros definitivos. O segundo estágio são os bradizoítos, que se multiplicam lentamente e localizam-se em cistos teciduais preferencialmente no tecido nervoso (SNC) de hospedeiros intermediários e definitivos. Este estágio representa uma forma de persistência, ou seja, uma condição de portador no hospedeiro, auxiliado fortemente pela ineficaz defesa do

sistema imune do hospedeiro (INNES et al., 2002). Os taquizoítos, que representam o terceiro estágio caracterizam-se por multiplicar rapidamente e são relacionados com a infecção ativa, desenvolvendo lesão pela rápida multiplicação e ruptura celular durante a fase aguda da infecção.

Os taquizoítos do *N. caninum* já foram detectados numa variedade de tecidos e tipos celulares, exibindo pouca especificidade celular, infectando células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais de túbulos renais e hepatócitos (HEMPHILL et al., 1999).

A habilidade efetiva do sistema imunológico do hospedeiro é descrito como o fator determinante para a resolução das conseqüências da infecção (ENTRICAN, 2002). Infecções crônicas provavelmente indicam que o sistema imunológico é incapaz de eliminar definitivamente o protozoário (KAUFMANN & STEWARD, 2005). Neste caso a cronicidade da doença é determinada pela instalação de cistos com bradizoítos principalmente no SNC. Infecções agudas e crônicas determinadas pelo *N. caninum* em bovinos são, representados por duas diferentes fases evolutivas da doença, de taquizoítos e bradizoitos, respectivamente, e as conseqüências clínicas destas duas fases diferem significativamente (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2009). Assim, a localização de regiões ou tecidos com maior possibilidade de receberem cistos teciduais contendo bradizoítos do protozoário em tecidos bovinos infectados, torna-se uma ferramenta de importância fundamental, para o diagnóstico e compreensão da patogênese da neosporose. Entretanto, a utilização exclusiva de bovinos em estudos é dispendiosa e fastidiosa. Neste sentido, cada vez mais buscam-se alternativas de estudos com animais de laboratório que mimetizam estas condições. Os roedores vêm sendo extensivamente estudados a esse respeito (LONG et al., 1998; BASZLER et al., 1999; EPERON et al., 1999; LIDDELL et al., 1999; COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2002). A cepa do

parasita e o modelo animal usado para trabalho experimental com *N. caninum* pode ter profunda influência sobre o resultado da pesquisa. Os gerbils (*Meriones unguiculatus*) são os animais de laboratório 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). Estes animais podem fornecer respostas a situações desconhecidas nos bovinos e são utilizados para reproduzir condições semelhantes as que ocorrem em bovinos, como: formação de cistos teciduais no cérebro, avaliação de parâmetros imunológicos, comparação da carga parasitária, lesões e respostas a citocinas inflamatórias (MCGUIRE et al., 1997; EPERON et al., 1999; KHAN et al., 1997; LONG et al., 1998). Seus tecidos 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).

Este estudo é composto por dois capítulos, nos quais estão apresentados resultados envolvendo a infecção aguda e crônica do *N. caninum*. Além disso, relaciona a invasão tecidual e persistência com a dose de antígeno e características da infecção.

O primeiro capítulo tem como objetivo principal, determinar as características da infecção aguda pelo *N. caninum* em modelos experimentais de gerbils (*M. unguiculatus*) e caracterizar os locais e tecidos preferencialmente utilizados para replicação do protozoário. O segundo capítulo baseia-se na determinação dos locais do SNC onde o *N. caninum* preferencialmente localiza-se para formar os cistos e demonstrar nestes animais, quais as conseqüências e sinais clínicos possíveis de se observar quando a quantidade de agente é branda.

2. CAPÍTULO I

Detecção de ácidos nucléicos em tecidos de gerbils submetidos à infecção aguda por *Neospora caninum*

Detection of nucleic acids in tissues of gerbils submitted to acute infection with *Neospora caninum*

**Gustavo Toscan^{1*}, Giovana Camillo², Augusto Weber², Caroline S. de Oliveira²,
Paulo B. D. Gonçalves³, Luis Antônio Sangioni³, Fernanda S. F. Vogel³**

(Artigo submetido na revista científica Ciência Rural, 2012)

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário de grande importância na pecuária, por determinar problemas reprodutivos principalmente em bovinos. Os gerbils (*Meriones unguiculatus*) podem atuar como modelos experimentais para reproduzir a neosporose aguda de bovinos. Neste trabalho foram formados dois grupos de gerbils (n=10), inoculados com taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1) nas doses de 5×10^6 taquizoítos/ml (G1) ou de 5×10^5 taquizoítos/ml (G2), doses capazes de induzir infecção aguda. Cérebro, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins e baço foram coletados

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071. E-mail: gugatoscan@hotmail.com.br. *Autor para correspondência.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM. Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071.

³ Hospital Veterinário, Biorep, CCR, UFSM, Camobi, Santa Maria, RS.

e a técnica de PCR foi realizada a partir das amostras de tecidos e órgãos. Na maioria dos animais, o DNA do *N. caninum* foi detectado pelo menos em cinco tecidos, considerando ambos os grupos (12/20; 60%). No grupo 1, a frequência de detecção de DNA, na totalidade das amostras, foi maior (52/70; 74,28%) quando comparada ao grupo 2 (38/70; 54,28%). A partir destes resultados pode-se afirmar que o protozoário replicou eficientemente após inoculação e se disseminou pelos tecidos. Além disso, demonstrou-se que gerbils podem ser utilizados como modelo de infecção aguda pelo *N. caninum* apresentando sinais clínicos da neosporose.

Palavras-chave: *N. caninum*, infecção aguda, distribuição tecidual.

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan of great importance for livestock, mainly by causing reproductive diseases in cattle. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) may be a model to reproduce experimental acute neosporosis of cattle. In this study two groups of gerbils were formed (n=10) and gerbils were inoculated with *N. caninum* tachyzoites (NC-1 strain) at two different doses appropriate to cause acute neosporosis: 5×10^6 tachyzoites/ml (G1) or 5×10^5 tachyzoites/ml (G2). Brain, spinal cord, heart, lung, liver, kidneys and spleen were collected and PCR was performed using samples of these tissues and organs. DNA of *N. caninum* was detected in at least five tissues for most animals (12/20; 60%) considering both groups. In group 1, the frequency of DNA detection, evaluating all samples, was higher (52/70; 74.28%) compared to group 2 (38/70; 54.28%). These results showed that the protozoan replicated efficiently after inoculation spreading by several tissues. Also, was demonstrated that gerbils can be used as model for acute infection with *N. caninum* showing clinical signs of neosporosis.

Key words: *N. caninum*, acute infections, tissue distribution.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo apicomplexa que apresenta distribuição mundial (DUBEY, 2003). Este agente é de grande importância na pecuária, uma vez que pode determinar perdas econômicas consideráveis, devido principalmente aos problemas reprodutivos (ANDERSON et al., 2000). Cães domésticos (MCALLISTER et al., 1998) e coiotes (GONDIM et al., 2004) são descritos como hospedeiros definitivos deste agente. Estes animais excretam oocistos do protozoário nas fezes, que após esporulados no meio ambiente, são ingeridos pelos hospedeiros intermediários. Diferentes espécies de mamíferos assumem a condição de hospedeiros intermediários como: bovinos, eqüinos, felinos, ovinos, caprinos e cães (DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2005). Entretanto, é nos bovinos que a infecção pelo *N. caninum* apresenta as maiores consequências, principalmente relacionadas à reprodução. No entanto, a principal forma de transmissão e manutenção do protozoário nos rebanhos é através da infecção vertical, no qual a vaca gestante transmite ao feto, uma vez que a maioria das infecções congênicas resulta no nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) (TREES & WILLIAMS, 2005).

Em bovinos, a infecção é caracterizada por perdas reprodutivas em fêmeas, podendo determinar diferentes consequências, sendo a morte embrionária a manifestação clínica mais comum durante o primeiro terço gestacional e abortos durante o segundo. No terço final da gestação, a infecção dificilmente acarreta em morte fetal e abortos, mas sim no nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI), o que também pode ocorrer no segundo terço gestacional (RAGHUPATHY, 1997; BIELSA et al., 2004). A resolução das consequências reprodutivas ocasionadas pela infecção do *N.*

caninum serão basicamente determinadas pela relação entre o sistema imunológico do hospedeiro e a resposta ao parasita (ENTRICAN, 2002). Na maioria dos animais, a infecção não é capaz de induzir imunidade protetiva, determinado uma condição de cronicidade em animais não prenhes, onde as conseqüências reprodutivas da infecção podem ocorrer repetidas vezes durante a vida dos animais infectados (MORALES et al., 2001; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2002; BIELSA et al., 2004). A escassez de dados a respeito da patogenia e métodos de controle desta enfermidade, faz com que seja de grande valia estudos em relação a estes aspectos da infecção pelo protozoário.

Infecções agudas e crônicas pelo protozoário *N. caninum* em bovinos são, respectivamente, representados por duas diferentes fases evolutivas da doença, de taquizoítos e bradizoítos. As conseqüências clínicas destas duas fases diferem significativamente (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2009). Por esta razão, a determinação de regiões com maior probabilidade de receberem cistos teciduais contendo bradizoítos do protozoário em tecidos bovinos infectados, torna-se uma ferramenta de fundamental importância, para o diagnóstico e compreensão da patogênese da neosporose. No entanto, a utilização exclusiva de bovinos em estudos de patogenia é dispendiosa e demorada. Neste sentido, diferentes espécies de animais de laboratório tem sido utilizadas como modelo experimental.

Os gerbils (*Meriones unguiculatus*) são os animais de laboratório utilizados como modelo experimental para mimetizar a infecção em bovinos, já que são considerados altamente sensíveis a replicação do protozoário e a neosporose aguda sem imunossupressão prévia (GONDIM et al., 2001). Esta característica foi demonstrada através da infecção com oocistos do protozoário *N. caninum* pela via oral, porém as observações encontradas em relação a patogenicidade desta infecção podem ser variáveis (DUBEY & LINDSAY, 2000). Adicionalmente, CUDDON et al., (1992),

GONDIM et al., (1999), GONDIM et al., (2001), revelaram que os gerbils são bastante sensíveis a doença e respondem satisfatoriamente quando inoculados intraperitonealmente com taquizoítos de *N. caninum*.

Embora existam inúmeras pesquisas no que diz respeito ao *N. caninum*, há lacunas de indefinições, que fundamentalmente necessitam de esclarecimentos, principalmente no que se refere ao ciclo e à patogenia do protozoário para que possam ser determinadas alternativas estratégicas competentes para o controle e profilaxia da neosporose bovina. Neste sentido, esta pesquisa objetivou: i. caracterizar a infecção aguda pelo *N. caninum* em modelos experimentais de roedores (*M. unguiculatus*) e ii. determinar quais os principais sítios de replicação do protozoário.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Fêmeas de *M. unguiculatus*, (20 animais) com idade de seis semanas foram adquiridas e mantidas no biotério do setor de virologia, em condições de temperatura e umidade controladas, alimentação e água fornecidas *ad libitum* durante todo o período do experimento. Os roedores foram divididos em dois grupos sendo cada grupo inoculado com doses diferentes contendo taquizoítos de *N. caninum* para caracterização da infecção aguda nesta espécie.

Preparação do antígeno:

Para a obtenção do antígeno, taquizoítos da cepa Nc-1 de *N. caninum* foram inoculados em cultivo de células Vero para multiplicação. Os cultivos celulares foram mantidos e extraídos os taquizoítos, até alcançar concentração aproximada de 1×10^7 taq/ml contados em câmaras de Neubauer. O inóculo foi preparado através da diluição dos taquizoítos para obtenção da concentração desejada.

Animais e Inoculação

Os animais foram divididos em dois grupos contendo dez animais cada. Todos os roedores foram submetidos à inoculação pela via intraperitoneal de inóculo contendo taquizoítos de *N. caninum* em duas diferentes concentrações *i*: Grupo 1: dose de 5×10^6 taquizoítos/ml; *ii*: Grupo 2: dose de 5×10^5 taquizoítos/ml (RAMAMOORTHY et al., 2005).

Avaliação clínica

Os animais foram avaliados diariamente quanto à presença de sinais clínicos como: a inclinação lateral da cabeça, pêlos arrepiados, anorexia, aumento de volume abdominal, prostração, incoordenação motora, paralisia de membros e movimentos circulares (*Neosporose Cerebral*) (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2009).

Coleta de tecidos

Os animais foram necropsiados e os tecidos foram avaliados macroscopicamente quanto ao aumento de volume, consistência e coloração. O líquido abdominal foi coletado e avaliado microscopicamente imediatamente no *post mortem*. Os seguintes tecidos foram coletados em um período de no máximo 12 horas *post mortem* ou após a eutanásia dos animais: cérebro, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins e baço. Todos os tecidos e órgãos foram lavados com solução salina fosfatada (PBS) no momento da coleta. O material foi acondicionado em tubos tipo eppendorf e armazenado temperatura de -20°C até o seu processamento.

Extração de DNA

As amostras de tecidos foram pesadas e maceradas para a extração do DNA. O ácido nucleico foi extraído de 15 a 25 mg de conteúdo, utilizando kit de extração com DNazol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme descrito pelo fabricante.

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de PCR foi realizada a partir das amostras de tecidos e órgãos utilizando-se primers para uma seqüência do gene NC5 do *N. caninum* (YAMAGE et al., 1996). A amplificação foi realizada de acordo com uma fase de denaturação 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C, 1 min.; 60°C, 30 seg; 70°C, 30 seg; e uma extensão final de 70°C por 5 minutos. O produto final da amplificação da reação, com peso molecular de 328pb, foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. DNA extraído de cultivo de células Vero infectadas com taquizoítos de *N. caninum* foi utilizado como controle positivo e DNA extraído de células Vero não infectadas como controle negativo.

Análise estatística

Foi utilizado o teste Qui-Quadrado com nível de significância de 5% para comparação do total de tecidos positivos entre os grupos e o teste de Fisher para a comparação da frequência de detecção de DNA entre tecidos nos dois grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão apresentados na tabela 1. Todos os animais, independente da dose inoculada, apresentaram sinais clínicos compatíveis com neosporose aguda. Os sinais clínicos observados foram de anorexia, redução na condição corporal, pêlos arrepidados e aumento de volume abdominal. Na necropsia, foi observada a presença marcante de exsudato fibrinoso no abdome. Os sinais clínicos foram mais precocemente observados e mais intensos nos animais do grupo 1 quando comparados aos grupo 2.

Nos animais do grupo 1, os sinais clínicos iniciaram 3 a 4 dias após a inoculação (p.i.) e persistiram por todo o período do experimento até a morte e/ou eutanásia dos

roedores. Metade dos animais (5/10) sofreram eutanásia *in extremis* ou morreram no dia cinco após inoculação. Três animais foram eutanasiados no dia 6 p.i, um no dia 7 p.i e outro no dia 8 p.i (Tabela 1). No grupo 2, os sinais clínicos iniciaram nos dias 5 e 6 dias p.i. e persistiram até o 7º (5 animais) ou 8º (5 animais) dia quando os animais foram eutanasiados. Ao exame macroscópico, os animais de ambos os grupos, apresentavam volume de líquido do abdome entre 0,5 a 2ml por animal, com marcada presença de células inflamatórias e presença de taquizoítos dispersos no conteúdo abdominal. Rins, baço e fígado estavam aumentados de volume. Os dados observados no estudo são semelhantes aos observados por RAMAMOORTHY et al., (2005).

O DNA do *N. caninum* foi detectado em pelo menos cinco tecidos (12/20; 60%), em seis animais em quatro tecidos (6/20; 30%), em um animal em 3 tecidos (1/20; 5%) e somente um animal foi detectado DNA apenas no rim (1/20; 5%). A partir destes resultados pode-se afirmar que o protozoário replicou eficientemente após inoculação e se disseminou pelos tecidos e órgãos. Em relação a concentração inoculada, percebe-se que nos animais do grupo 1, a frequência de detecção de DNA foi maior (52/70; 74,28%) quando comparada ao grupo 2 (38/70; 54,28%) (com nível de significância de 5%; $p=0,0135$).

Analisando-se os tecidos em separado, nos animais do grupo 1 (Tabela 1), em todos os animais foi detectado DNA do protozoário no pulmão (10/10; 100%), em nove animais no coração (90%), no baço (90%) e rim (90%). No fígado, sete animais foram positivos (70%). De acordo com estes dados, fica evidente que o protozoário, após a infecção inicial, apresenta ampla distribuição nos diferentes tecidos dos roedores. Assim, durante a infecção aguda estes tecidos poderiam ser utilizados para pesquisa de proteínas, ácidos nucleicos ou ainda isolamento do protozoário. No sistema nervoso central, em 4 animais foram detectados DNA através da reação de PCR. O mesmo

resultado foi encontrado em relação a medula espinhal. Apenas no gerbil 3, DNA foi detectado tanto no cérebro como na medula. Estes dados reforçam que a infecção do SNC ocorre de forma mais tardia e é característico da infecção crônica (KANG et al., 2009).

Já os animais do grupo 2 (Tabela 1), em 90% dos animais a reação de PCR foi positiva no rim. DNA do protozoário foi detectado em seis animais no coração e no baço (60%). No fígado, cinco animais foram positivos (50%) e sete gerbils foram positivos na reação de PCR no pulmão (70%). No cérebro e medula analisados, foram detectados ácidos nucléicos específicos do *N. caninum* em três e dois animais respectivamente. Apenas o gerbil 17, foi positivo para ambos os tecidos.

Os resultados da reação de PCR, quando analisados apenas os rins, a frequência de positivos nos dois grupos foi a mesma (9/10). A ocorrência de positividade de ácidos nucléicos foi maior em todos os tecidos dos animais do grupo 1 quando comparado com os tecidos dos gerbils do grupo 2. Para coração e baço do grupo 1 a frequência encontrada (9/10) foi mais elevada que os animais do grupo 2 (6/10). Para amostras de pulmão a positividade no grupo 1 foi de 100%, no grupo 2 foi encontrada em apenas 7 animais (70%). Estes dados corroboram com os resultados encontrados por LOPEZ-PEREZ et al., (2006) que detectaram no pulmão taquizoítos de *N. caninum* na fase aguda da infecção e atribuiu estes elevados níveis encontrados nesse órgão à afinidade do agente ao tecido para replicação nos primeiros dias pós-infecção e que estes valores reduzem com a evolução da enfermidade para um estágio crônico da doença. Com base nos resultados da infecção aguda em ambos os grupos, sugere-se que em roedores, os tecidos que devem preferencialmente ser coletados para o diagnóstico são os rins, pulmão e baço devido a frequência de detecção encontrados. Mais estudos precisam ser desenvolvidos para determinar esta relação em bovinos.

Embora os animais não tenham sido eutanasiados sequencialmente após a inoculação, no presente estudo, a tendência de invasão e distribuição tecidual do *N. caninum*, verificada pela frequência acumulada dos dois grupos foram rim>pulmão>baço=coração>fígado>cérebro>medula. Estes dados podem sugerir que a infecção inicial ocorre nos rins e pulmões e se distribuem pelos outros tecidos durante a infecção aguda e mais tardiamente formarão cistos especialmente no SNC.

Conforme KANG et al., (2009), o SNC é o local mais tardiamente invadido pelo parasita, o que pode justificar a menor frequência de detecção nestes tecidos em nosso estudo, embora o período de avaliação seja pequeno. Assim, os sinais clínicos encontrados nos animais durante o experimento foram decorrentes da infecção aguda e replicação em outros órgãos e tecidos. A evolução da infecção foi a morte dos animais ou eutanásia “*in extremis*” não permitindo o desenvolvimento de infecção crônica/persistente, uma vez que a dose infectante administrada nos animais foi alta. Os resultados encontrados no cérebro e medula nos animais do grupo 1 (8/20; 40%) foram semelhantes aos do grupo 2 (5/20; 25%) (nível de significância; $p=0,3112$). Este resultado é relevante, pois independente das doses utilizadas no estudo, o protozoário invadiu o SNC. A infecção do SNC é de grande importância na epidemiologia da infecção, uma vez que este tecido atua como local de refúgio do parasita e é um importante sítio de privilégio do sistema imune (WILSON et al., 2010), além disso, é um dos locais onde o parasita forma cistos com bradizoitos e desta forma o animal pode permanecer cronicamente infectado (NISIKAWA et al., 2001; COLLATES-FERNÁNDEZ et al., 2006). Outros trabalhos já detectaram DNA do protozoário no SNC a partir de modelos experimentais (COLLATES-FERNÁNDEZ et al., 2006, KANG et al., 2009). PEREIRA GARCÍA-MELO, (2010), através da técnica de qRT-PCR, detectaram ácidos nucleicos do protozoário utilizando diferentes cepas de *N.*

caninum em camundongos da linhagem BALB/c. Na maioria das cepas, DNA foi detectado no SNC substancialmente a partir do dia 8 após inoculação. No entanto, para o isolado Nc-Sp 2H, DNA do protozoário foi detectado no cérebro no primeiro dia após a inoculação. Diferenças na detecção de DNA do protozoário no SNC podem ocorrer dependendo da dosagem do inóculo utilizada, da cepa ou isolado, da espécie de roedor, da idade dos animais e também da sensibilidade do teste utilizado – (PCR/qRT-PCR). Além disso, NISIKAWA et al., (2001), COLLATES-FERNÁNDEZ et al., (2006), KANG et al., (2009), PEREIRA GARCÍA-MELO et al., (2010), reafirmam que estes tecidos são um sítio de localização dos protozoários na fase tardia da infecção, ou seja, fase crônica da neosporose.

Quanto à reprodução da infecção aguda em modelo experimental, camundongos apresentam lesão predominante identificada em exames histopatológicos pneumonia linfocitocitária (LINDSAY & DUBEY, 1990). Comparando com o presente trabalho, pode-se perceber que o pulmão é também um importante sítio de replicação em gerbil (LINDSAY & DUBEY, 1990; LINDSAY et al., 1995).

A utilização destes animais, como um instrumento de análise laboratorial, torna-se uma importante ferramenta para estudos de patogenia, testes de produção e proteção vacinal, diagnóstico da enfermidade, estudos no desenvolvimento de medicamentos eficazes para o controle e tratamento da enfermidade ou ainda, determinar virulência de isolados de campo (ATKINSON et al., 1999, QUINN et al., 2002).

É importante estabelecer as melhores condições necessárias para reproduzir a enfermidade laboratorialmente. Para tal, o conhecimento do melhor modelo animal é fundamental para estabelecer esta situação. Esta condição é encontrada com os gerbils (*M. unguiculatus*), sendo considerada a espécie que melhor representa estas condições

(GONDIM et al., 2001), ao passo que *Mus musculus* e camundongos da linhagem BALB/c dependem de imunossupressão prévia para reproduzir a doença.

Os gerbils assumem, neste contexto, papel imprescindível no esclarecimento da patogenia desta enfermidade, determinada por inúmeras vantagens da sua utilização a exemplo: possuir a capacidade de obter dados e resultados em curto período, ser um animal naturalmente sensível a infecção, produzir resposta imunológica e as manifestações clínicas da doença, fácil manipulação, apresentar custos baixos de execução, quando estas características são comparadas com demais hospedeiros. Os resultados obtidos nestes modelos animais devem poder ser correlacionados e mimetizar as características assumidas pelo *N. caninum* em hospedeiros intermediários, principalmente nos bovinos.

CONCLUSÃO

Com este trabalho, pode-se concluir que o *N. caninum* foi capaz de infectar e replicou eficientemente nos tecidos dos gerbils infectados. Além disso, a utilização deste modelo experimental que demonstra sinais clínicos, não depende de imunossupressão prévia e é sensível a infecção aguda ao protozoário, é sem dúvida, uma importante ferramenta na pesquisa da patogenia e no desenvolvimento de vacinas contra o *N. caninum*.

COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O Projeto foi aprovado no Comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) com o registro número: 92/2010.

REFERÊNCIAS

AGUADO-MARTÍNEZ A., et al., Stage-specific expression of NcSAG4 as a marker of chronic *Neospora caninum* infection in a mouse model. **Parasitology**. v.136, p.757-764, 2009.

ANDERSON M.L., et al., Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**. v.60-61, p.417-431, 2000.

ATKINSON R., et al., Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**. v.118, p.363-370, 1999.

BIELSA, J.M., et al., Controle de neosporose em bovinos com Bovilis^o Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, n.1, p.34-37, 2004.

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.

CUDDON P., et al., *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. **Journal Veterinary International Medicine**. v.6, p.325-332, 1992.

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., et al. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal Parasitology**. v.32, p.99-105, 2002.

DUBEY J.P. Neosporosis in Cattle. **Parasitology**. v.89, p.42-56, 2003.

DUBEY J.P. Neosporosis in cattle. **Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice**. v.21, p.473-483, 2005.

ENTRICAN G., Immune control during pregnancy and host–pathogen interactions in infectious abortion. **Journal Comparative Pathology**. v.126, p.79–94, 2002.

GARCIA-VAZQUEZ Z., et al., Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**. v.106, p.115–120, 2002.

GONDIM L.F.P., et al., Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.86, p.71-75, 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., Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Journal Parasitology**. v.34, p.159-161, 2004.

KANG S.W., PARK et al., Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. **Parasitology Research**. v.104, p.1261-1268, 2009.

LINDSAY D.S., et al., Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. **Journal Parasitology**. v.81, p.313–315, 1995.

LINDSAY D.S. & DUBEY J.P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **Journal Parasitology**. v.76, p.410–413, 1990.

LÓPEZ-PÉREZ I.C, et al., Comparative effect of *Neospora caninum* infection in balb/c mice at three different gestation periods. **Journal Parasitology**. v.92, n.6 p.1286-1291, 2006.

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

MORALES E., et al., Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal Comparative Pathology**. v.125, p.58–63, 2001.

NISHIKAWA Y., Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in Balb/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. **Vaccine**. v.19, p.1710-1716, 2001.

PEREIRA GARCIA-MELO D., et al., Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. **Parasitology**. v.137, n.7, p.1057-1068, 2010.

QUINN H.E., et al., Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. **Journal Parasitology**. v.88, p.691–696, 2002.

RAGHUPATHY R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**. v.18, p.478–482, 1997.

RAMAMOORTHY S., et al., Gerbil model of acute neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v.127, p.111-114, 2005.

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

YAMAGE M., et al., *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction. **Journal Parasitology**. v.82, n.2, p.272-279, 1996.

WILSON E.H., et al., Trafficking of immune cells in the central nervous system. **Journal Clinic Investigation**. v.120, n.5, p.1368-1379, 2010.

Tabela 1: Detecção de ácidos nucleicos (DNA) do *Neospora caninum* pela técnica de PCR em amostras de tecidos de gerbil (*Meriones unguiculatus*) submetidos infecção aguda com inoculação de 5×10^6 taq/ml (Grupo 1) e 5×10^5 taq/ml (Grupo 2).

Animais	Eutanásia ^o	Tecidos analisados							Total / Percentual
		Cérebro	Medula	Coração	Pulmão	Baço	Fígado	Rim	
GRUPO 1 (5×10^6 taq/ml)									
1	5*	-	-	+	+	+	+	-	4/7;
2	6	-	+	+	+	+	+	+	6/7;
3	6	+	+	+	+	+	-	+	6/7;
4	6	-	+	+	+	+	+	+	6/7;
5	7	-	+	+	+	-	+	+	5/7;
6	5*	-	-	+	+	+	-	+	4/7;
7	5	+	-	+	+	+	+	+	6/7;
8	5	+	-	+	+	+	+	+	6/7;
9	5	+	-	+	+	+	+	+	6/7;
10	8*	-	-	-	+	+	-	+	3/7;
Total /		4/10;	4/10;	9/10;	10/10;	9/10;	7/10;	9/10;	
GRUPO 2 (5×10^5 taq/ml)									
11	7	-	-	+	+	+	-	+	4/7;
12	7	-	-	+	+	+	+	+	5/7;
13	7	+	-	-	+	+	-	+	4/7;
14	7	-	-	+	+	-	+	+	4/7;
15	7	-	-	-	+	-	+	+	3/7;
16	8	-	-	+	-	+	+	+	4/7;
17	8	+	+	+	+	-	+	+	6/7;
18	8	+	-	+	+	+	-	-	4/7;
19	8	-	-	-	-	-	-	+	1/7;
20	8	-	+	-	-	+	-	+	3/7;
Total /		3/10;	2/10;	6/10;	7/10;	6/10;	5/10;	9/10;	

*Morte espontânea

^oDias após-inoculação.

3. CAPÍTULO II

Detecção de DNA do *Neospora caninum* durante infecção crônica em gerbils

Detection of DNA from *Neospora caninum* during chronic infection in gerbils

**Gustavo Toscan^{1*}, Agueda C. de Vargas², Luis Antônio Sangioni², Augusto
Weber², Paulo B.D. Gonçalves³, Gabriel R. Pereira³, Fernanda S.F. Vogel²**

(Artigo a ser submetido na revista científica *Ciência Rural*, 2012)

RESUMO

A neosporose, doença causada pelo *Neospora caninum*, é classificada atualmente como uma enfermidade emergente, que compreende duas fases evolutivas, caracterizadas por infecção aguda e crônica. Modelos experimentais, são utilizados para mimetizar estas fases da infecção em bovinos. No estudo, foram utilizadas 27 fêmeas de *M. unguiculatus*, divididos em três grupos, inoculados com *N. caninum* (Nc-1) em pequenas doses capazes de induzir enfermidade crônica nos roedores. GA: nove animais com dose 5×10^4 , GB: oito animais com dose 5×10^3 e GC: dez animais com dose 5×10^2 taq/ml. Tecidos de todos os animais foram coletados (SNC, medula espinhal, coração,

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071. E-mail: gugatocan@hotmail.com.br. *Autor para correspondência.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM. Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071.

³ Hospital Veterinário, Biorep, CCR, UFSM, Camobi, Santa Maria, RS.

pulmão, fígado, rins e baço) e analisados para a detecção de DNA pela reação de PCR e o SNC foi dividido em três segmentos (anterior central e posterior) para reação de qRT-PCR. No grupo A, cinco gerbils desenvolveram infecção aguda. Estes animais foram positivos na PCR no pulmão, baço e rins em todas as amostras, fígado (2/5; 40%) e coração (1/5; 20%). Os animais 6, 7, 8 e 9, sucumbiram espontaneamente a infecção, desenvolveram sinais de infecção crônica e foram negativos em todas as amostras analisadas por PCR. No grupo B, três animais foram positivos em tecidos como rins 37,5% (3/8), fígado, baço e pulmão, 20% (2/8) e coração, 12,5% (1/8) e cinco roedores resistiram a infecção e ao longo do tempo apresentaram manifestações neurológicas. No grupo C, o tecido em que mais frequentemente foi detectado amostras positivas foi rins 3/10, seguidos de pulmão e baço 2/10 e fígado 1/10. Medula espinhal e SNC foram negativos em todos os grupos. Nas secções do tecido nervoso dos animais (GA e GB) que manifestaram sinais clínicos da infecção persistente, 70% (7/10) dos animais foram positivos para secção anterior, sugerindo como local preferencial de formação de cistos no SNC. Desta forma, podemos concluir que nos gerbils a dosagem de antígenos capaz de induzir a infecção crônica foi de 5×10^3 taq/ml de *N. caninum*, uma vez que foram observadas as características da infecção persistente com detecção de amostras positivas, preferencialmente na região anterior do SNC.

Palavras-chave: *Meriones unguiculatus*, infecção crônica, neosporose, SNC.

ABSTRACT

The neosporosis, disease caused by *Neospora caninum*, is currently classified as an emerging disease, which comprises two evaluative phases, characterized by acute and chronic infection. Experimental models are used to mimic these phases of infection in cattle. In this study, we used 27 females of *M. unguiculatus*, divided into three groups,

inoculated with *N. caninum* (Nc-1) in small doses that induce chronic disease in rodents. GA: nine animals with dose 5×10^4 , GB: eight animals dose 5×10^3 and GC: dose ten animals with 5×10^2 taq/ml. Tissues of all animals were collected (CNS, spinal cord, heart, lung, liver, kidneys and spleen) and analyzed for DNA detection by PCR and the CNS was divided into three segments (anterior, center and posterior) for qRT-PCR reaction. In group A, five gerbils developed acute infection. These animals were PCR positive in the lung, spleen and kidneys in all samples, liver (2/5, 40%) and heart (1/5, 20%). The animals 6, 7, 8 and 9, spontaneously succumbed to infection, developed signs of chronic infection and were negative in all samples analyzed by PCR. In group B, three animals were positive in tissues such as kidneys 37.5% (3/8), liver, spleen and lung, 20% (2/8) and heart, 12.5% (1/8) and five rodents resisted infection and over time showed neurological symptoms. In group C, the tissue has been detected more often positive samples kidneys 3/10, followed by lung and spleen 2/10 and liver 1/10. Spinal cord and CNS was negative in all groups. In sections of the CNS of animals (GA and GB) which showed clinical signs of persistent infection, 70% (7/10) animals were positive for the anterior section, suggesting as preferential formation of cysts in the CNS. Thus, we conclude that in gerbils the dosage of antigen can induce chronic infection was 5×10^3 taq/ml of *N. caninum*, since it showed the characteristics of persistent infection with detection of positive samples, preferably in the anterior region of the CNS.

Key-words: *Meriones unguiculatus*, chronic infection, neosporosis, CNS.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo apicomplexa que apresenta grande importância na pecuária e determina, atualmente,

uma enfermidade de caráter emergente, principalmente devido aos problemas reprodutivos envolvidos (ANDERSON et al., 2000). Este agente tem como hospedeiro definitivo cães domésticos (MCALLISTER et al., 1998) e selvagens como os lobos (*Canis lupus*), descritos recentemente (DUBEY et al., 2011). Estes animais excretam oocistos do protozoário nas fezes que após esporulados no meio ambiente são ingeridos pelos hospedeiros intermediários.

Os bovinos, assim como uma ampla variedade de outras espécies de mamíferos, são considerados os hospedeiros intermediários desta protozoose (DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2005). Contudo, é nesta espécie que a infecção pelo *N. caninum* apresenta as maiores conseqüências, principalmente relacionadas à reprodução. A principal forma de manutenção e transmissão deste protozoário nos rebanhos é através da infecção transplacentária. A transmissão ocorre quando uma fêmea gestante, cronicamente infectada, transmite a doença ao feto, sendo que a maioria das infecções congênitas resulta no nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) (TREES & WILLIAMS, 2005).

A neosporose compreende duas fases evolutivas, caracterizadas por infecção aguda e crônica, sendo os taquizoítos e bradizoítos, respectivamente, as formas infectantes presentes em cada fase e as conseqüências clínicas destas duas fases diferem significativamente (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2009), desta forma é fundamental conhecer o estabelecimento dos sítios de replicação/localização nos tecidos dos animais. Por esta razão, a determinação das regiões com maior probabilidade de localização dos cistos com bradizoítos em tecidos bovinos, torna-se de grande importância, para o diagnóstico e compreensão da patogênese da neosporose. No entanto, a utilização exclusiva de bovinos em estudos de patogenia é dispendiosa e demorada (INNES et al., 2000).

Atualmente, há uma grande escassez de dados a respeito da patogenia e métodos de controle desta enfermidade. Desta forma, faz-se necessário novos estudos em relação a estes aspectos, para melhor esclarecer a infecção pelo protozoário *N. caninum*. Neste sentido, diferentes espécies de animais de laboratório tem sido utilizadas como modelos experimentais, além de oferecem um sistema econômico e conveniente para testar vacinas contra a neosporose (ELLIS et al., 2008). Os gerbils (*Meriones unguiculatus*) são os animais de laboratório 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).

Esta pesquisa objetivou caracterizar a infecção crônica/persistente pelo *N. caninum* em gerbils (*M. unguiculatus*), viabilizar a técnica de qRT-PCR para o diagnóstico e estabelecer quais os principais sítios de localização do protozoário nestes animais, principalmente no Sistema Nervoso Central.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Fêmeas de *M. unguiculatus*, (27 animais) com idade de seis semanas foram alojadas em ambiente com condições de temperatura e umidade controladas, com alimentação e água fornecidas *ad libitum* durante todo o período do experimento. Os roedores foram divididos em três grupos, sendo que cada grupo foi inoculado com doses diferentes do antígeno para caracterização da infecção crônica nesta espécie.

Antígeno e Inoculação

Para a obtenção do antígeno, taquizoítos da cepa Nc-1 de *N. caninum* foram mantidos em cultivo de células Vero para multiplicação. Os taquizoítos foram extraídos destes cultivos celulares e contados em câmaras de Neubauer. Para obtenção da

concentração desejada para cada grupo, os taquizoítos obtidos foram diluídos em meio RPMI.

Os animais foram divididos em três grupos, nove animais no Grupo A, oito animais no Grupo B e dez animais no Grupo C. Todos os roedores foram submetidos à inoculação pela via intraperitoneal contendo taquizoítos de *N. caninum* em três diferentes concentrações, segundo (RAMAMOORTHY et al., 2005) *i*: Grupo A: dose de 5×10^4 taquizoítos/ml; *ii*: Grupo B: dose de 5×10^3 taquizoítos/ml e *iii*: Grupo C: dose de 5×10^2 taquizoítos/ml. As dosagens estabelecidas para monitoramento da infecção crônica foram determinadas após a caracterização da infecção aguda (TOSCAN et al., 2012).

Avaliação clínica

Os animais foram avaliados diariamente quanto à presença de sinais clínicos até o final do experimento (60 dias) como: prostração, pelos arrepiados, anorexia, aumento de volume abdominal, inclinação lateral da cabeça, incoordenação motora, paralisia de membros e movimentos circulares (*Neosporose Cerebral*) (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2009). A evolução da doença dos diferentes grupos foram classificadas de acordo com ROJO-MONTEJO et al., (2011), que determinou a fase de infecção aguda compreendia de 1-5 dias pós-desafio e a fase de crônica da infecção dos dias 14-30 pós-desafio.

Coleta de tecidos

Os roedores foram necropsiados e os tecidos avaliados macroscopicamente quanto ao aumento de volume, consistência e coloração. Tecidos de todos os animais foram coletados no momento do *post mortem* ou após a eutanásia a saber: SNC, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins e baço. O SNC foi seccionado em três fragmentos (anterior, central e posterior, Anexo 1) nos animais que foram eutanasiados

a partir do dia 18 após a infecção. Todos os tecidos e órgãos foram lavados com solução salina fosfatada (PBS) no momento da coleta. O material foi acondicionado em tubos tipo eppendorf e armazenado temperatura de -20°C até o seu processamento.

Extração de DNA

As amostras de tecidos (15 a 25 mg de conteúdo) foram pesadas e maceradas para a extração do DNA, utilizando kit de extração com DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme descrito pelo fabricante.

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de PCR foi realizada a partir das amostras de tecidos e órgãos utilizando-se *primers* para uma seqüência do gene Nc-5 do *N. caninum* (YAMAGE et al., 1996). A amplificação foi realizada de acordo com uma fase de denaturação 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C, 1 min.; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min; e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. O produto final da amplificação da reação, com peso molecular de 328pb, foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. DNA extraído de cultivo de células Vero infectadas com taquizoítos de *N. caninum* foi utilizado como controle positivo e DNA extraído de células Vero não infectadas como controle negativo para as reações de PCR convencional e qRT-PCR.

Técnica quantitativa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

Esta técnica foi realizada a partir das secções do SNC dos animais dos grupos A, B e C. As reações foram preparadas com reagentes padronizados para qRT-PCR (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems) adicionado aos conjuntos de *primers* e sonda específico para o gene Nc-5 do *N. caninum* (YAMAGE et al., 1996),

(*Forward*: TCCAATCCTGTAACGTGTTGCT,

Reverse:

CACAAACAAAAAGGAGCCTTGCT, e *Probe*: FAM-CTGCGCCCAACAAC). As condições da reação foram de 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. O aumento na emissão de fluorescência foi detectado empregando o fluoróforo SYBR Green I. Esse fluoróforo somente é detectado quando ligado a dupla fita de DNA, sendo, portanto, a emissão de fluorescência proporcional a quantidade de DNA amplificado. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (Applied Biosystems). O controle interno positivo (IPC) pré otimizado com a função de distinguir verdadeiros alvos negativos de inibidores de PCR foi utilizada para as reações das amostras.

Análise estatística

Foi utilizado o teste Qui-Quadrado com nível de significância de 5% para comparação da frequência de detecção entre os grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Nos animais do grupo A, os sinais clínicos da infecção aguda foram evidentes entre 7 a 10 dias após a inoculação (p.i.) em cinco animais. Estes animais apresentavam sinais clínicos característicos da enfermidade aguda, entretanto, em intensidades variáveis. Três animais morreram no dia 9 p.i. e um animal morreu no dia 10 p.i. Um gerbil foi eutanasiado no dia 11 p.i. Os animais que sobreviveram a infecção, apresentaram sinais clínicos como: inclinação lateral da cabeça, incoordenação motora, paralisia de membros e movimentos circulares (*Neosporose Cerebral*). Porém, os sinais apresentados por estes animais foram distintos e mais tardios comparados aos animais

que morreram ou ao que foi eutanasiado. Os animais com sinais crônicos da enfermidade sofreram eutanásia *in extremis* nos dias 58 p.i. (um animal) e no dia 60 p.i. (três animais) (Tabela 1). Neste grupo, pelo tempo decorrido desde a inoculação, caracterizou-se que os animais 1, 2, 3, 4 e 5 morreram ou sofreram eutanásia durante a infecção aguda e os 6, 7, 8 e 9 durante a infecção crônica.

No grupo B, dois animais apresentaram os sinais clínicos de enfermidade aguda nos dias 5 e 6 p.i. e persistiram até o 7º e 8º dia, respectivamente, quando os animais morreram espontaneamente. Aos 18 dias p.i. um animal foi sacrificado com sinais de infecção aguda. Cinco roedores resistiram a infecção e ao longo do tempo apresentaram infecção crônica/persistente com manifestações neurológicas, observados mais tardiamente que o grupo A e que perduraram até o final do experimento. Desta forma, os animais 11, 12 e 13 foram caracterizados como infecção aguda e os 14, 15, 16, 17 e 18 como infecção crônica.

Os animais do grupo C não apresentaram sinais clínicos da enfermidade aguda. Um animal morreu espontaneamente aos 12 p.i., dois roedores aos 13 p.i., outros dois aos 40 p.i.. Cinco gerbils, foram eutanasiados ao final do experimento após 60 dias de inoculação, caracterizando a infecção crônica (24, 25, 26, 27 e 28), apresentando sinais clínicos aparentes de disfunções neurológicas brandas ou ausentes.

Neste grupo C, onde a dose infectante em cada animal foi inferior que aos demais grupos, observamos que provavelmente este volume de taquizoítos inoculados foi incapaz de reproduzir a infecção em sua plenitude, sendo que grande parte dos sinais clínicos evidenciados pelos animais, foram observados ao término do experimento ou próximo do momento da morte dos animais deste grupo. No entanto, nos animais 21, 22 e 23, pode-se perceber que a infecção resultou em sinais mais brandos e morte ou eutanásia dos animais.

Na análise dos tecidos pela reação de PCR dos animais do grupo A (gerbils 1, 2, 3, 4 e 5) que morreram ou sofreram eutanásia durante a infecção aguda, as amostras de DNA das secções do SNC e medula espinhal foram todas negativas. No entanto, foram PCR-positivos na reação, dois animais no fígado (2/5; 40%) e um animal no coração (1/5; 20%). No pulmão, baço e rins destes cinco animais foram detectados ácidos nucleicos do protozoário em todas as amostras. Os animais 6, 7, 8 e 9, que sucumbiram espontaneamente a infecção, foram negativos para este teste em todas as amostras de tecidos analisados.

Todas as amostras do SNC dos animais processadas pela técnica de PCR foram negativas. As secções do SNC dos animais com sinais neurológicos evidentes de infecção crônica (animal 6 ao 9), foram processadas por outra técnica. A qRT-PCR empregada neste caso, demonstrou positividade em três animais, sendo na região anterior do animal 6 e posterior do animal 7. No gerbil 8, as três regiões do SNC processadas foram positivas. No animal número nove deste grupo, o DNA do protozoário não foi detectado.

Apenas os gerbils 11, 12 e 13, demonstraram ocorrência de detecção de DNA nos tecidos, no qual representam os animais positivos deste grupo B. Portanto, estes três animais foram positivos à PCR em tecidos como rins 37,5% (3/8), fígado, baço e pulmão, 20% (2/8) e coração, 12,5% (1/8). Assim como no grupo anterior a medula espinhal de todos os animais foi negativa para o teste.

Em se tratando de SNC, cinco animais foram positivos para a reação de qRT-PCR, sendo que os animais 13 e 15 apresentaram aumento da emissão de fluorescência, portanto positivas, nas três regiões analisadas. No gerbil 17 foi detectado DNA do *N. caninum* apenas na porção anterior e os gerbils 18 e 19 foram positivos apenas para a região central do cérebro.

No grupo C, foi possível detectar ácidos nucleicos do *N. caninum* pela reação de PCR apenas em quatro animais, sendo que o tecido mais frequentemente encontrado foi novamente o rim 3/10, seguidos de pulmão e baço 2/10 e fígado 1/10. Todas as amostras positivas foram provenientes de apenas três animais (21, 22 e 23). Os tecidos como a medula espinhal e coração foram negativos na reação. Na análise tecidual dos fragmentos do SNC através da técnica de qRT-PCR, apenas o animal número 30 foi positivo na região posterior do cérebro.

Baseado em estudos anteriores com outros modelos animais, (EPERON et al., 1999; LIDDELL et al., 1999; COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2002) sabemos que o SNC, principalmente o cérebro, é considerado um dos locais preferenciais para estabelecimento de cistos na fase da infecção crônica do protozoário. Assim a segmentação do SNC teve por objetivo a determinação de qual área preferencialmente o protozoário se encista durante a infecção crônica. O presente trabalho possibilitou identificar as regiões onde o *N. caninum* teve maior frequência de detecção de DNA do protozoário. O segmento do cérebro que compreende a parte anterior foi positiva para 7 das 10 (70%) amostras analisadas dos animais do grupo A e B, onde os animais demonstraram sinais clínicos da enfermidade crônica. Além disso, é importante observar que o grupo C, apenas uma amostra foi positiva (posterior do animal 30), o que sugere que a dosagem inoculada neste grupo não foi significativamente consistente para determinar a infecção e manifestação de quaisquer evidências neurológicas da neosporose cerebral nestes animais.

Desta forma, a quantidade de inóculo determinou, fundamentalmente o curso da enfermidade. Como podemos observar neste trabalho, a dose inoculada nos roedores determinou a presença dos sinais clínicos da enfermidade aguda nos animais 1 à 5 do grupo A.

Nos grupos A e B, observou-se que o protozoário replicou eficientemente na maioria dos animais e promoveu o sucesso no estabelecimento da infecção. Nos animais que sobreviveram a infecção aguda, o processo evoluiu para uma infecção crônica/persistente (COLANTES-FERNANDES, 2002), sem a indução de infecções letais e severas nos animais (GOTTSTENIN et al., 2001).

Comparando os resultados obtidos neste experimento com estudos prévios (TOSCAN et al., 2012), observamos que a dose inoculada interfere significativamente na indução de infecção aguda e crônica. Isto sugere que a habilidade de cada roedor de controlar a expansão dos parasitas depende a dose inicial da infecção, e isso se reflete na quantidade de detecção de ácidos nucleicos nos diferentes tecidos, especialmente no SNC (LONG et al., 1998, GOTTSTEIN et al., 2001).

Neste contexto, podemos observar que a morte espontânea de alguns animais do grupo C, foram mais tardias que nos demais grupos e que se aproximaram do dia 15 p.i., no qual é considerado por GOTTSTEIN et al., (2001), como ponto-crítico para a seleção entre significativa distribuição parasitária e defesa imunológica (redução na quantidade e distribuição de taquizoítos).

Além disso, estudos com modelos da infecção crônica pelo *N. caninum*, podem ser usados para o esclarecimentos sobre a patogênese, modulação do curso da doença, persistência no SNC e para estudos de fatores que influenciam a recrudescência (COLANTES-FERNANDES, 2002), o que seria difícil conseguir utilizando bovinos (INNES et al., 2000).

Portanto, é importante que um modelo animal possa proporcionar respostas satisfatórias, com parâmetros consistentes, com uma exata dose de desafio e com sinais clínicos conhecidos, para viabilizar a sua utilização, sem negligenciar os aspectos fundamentais, facilitando assim, o desenvolvimento de métodos de controle e

diagnóstico do *N. caninum*. Além disso, é importante aprofundar mais estes estudos, no que diz respeito aos perfis de citocinas em ambas as fases da doença, métodos e drogas de tratamento, as respostas de anticorpos e percentual de transmissão vertical para assegurar a utilização deste modelo e viabilizar pesquisas com estes animais na infecção pelo *N. caninum*.

Desta forma, podemos concluir que a utilização da técnica qRT-PCR para a pesquisa de DNA de *N. caninum* foi importante para o diagnóstico da infecção crônica por este protozoário. Além disso, podemos definir que nestes animais (*M. unguiculatus*), a dosagem de antígenos capaz de induzir a infecção crônica foi de 5×10^3 taq/ml, uma vez que foram observadas as características da infecção persistente com detecção de amostras positivas, preferencialmente na região anterior do SNC.

COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O Projeto foi aprovado no Comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) com o registro número: 92/2010.

REFERÊNCIAS:

AGUADO-MARTÍNEZ, A. et al. Stage-specific expression of NcSAG4 as a marker of chronic *Neospora caninum* infection in a mouse model. **Parasitology**. v.136, p.757–764, 2009.

ANDERSON, M. L. et al. Neosporosis in cattle, **Animal Reproduction Science**. v.60-61, p.417-431, 2000.

COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiologic**. v.4, p.1194-1198, 2002.

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. et al., Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal Parasitology**. v.32, p.99-105, 2002.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Foods Animals Practice**. v.21, p.473-483, 2005.

DUBEY J.P. et al., Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum* **Veterinary Parasitology**. v.181, p.382– 387, 2011.

ELLIS, J., MILLER, C., QUINN, H., RYCE, C., REICHEL, M.P., Evaluation of recombinant proteins of *Neospora caninum* as vaccine candidates (in a mouse model). **Vaccine**. v.47, n.26, p.5989–5996, 2008.

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.

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.

GOTTSTEIN, B. et al., Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. **Parasitology Research**. v.87, p.43-48, 2001

INNES E.A, et al., Neosporosis: aspects of epidemiology and host immune response. **Annals of the New york academy of science**. v.916, p.93-101, 2000.

LIDDELL, S. et al. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. **Journal Parasitology**. v. 85, p. 550–555, 1999.

LONG, M. et al. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **Journal**

Parasitology. v.84, p.316-320, 1998.

MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*.

International Journal for Parasitology. v.28, p.1473-1478, 1998.

RAMAMOORTHY, S., et al. Gerbil model of acute neosporosis. **Veterinary Parasitology.** v.127, p.111-114, 2005.

ROJO-MONTEJO, et al., Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. **Veterinary Parasitology.** v.175, p. 220–229, 2011.

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

TOSCAN, et al., Detecção de ácidos nucleicos em tecidos de gerbils submetidos à infecção aguda por *Neospora caninum*. **Ciência Rural**, n.xx, p.xx-xx, 2012.

YAMAGE, M. et al. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology.** v.82, n.2, p.272-279, 1996.

Tabela 1: Detecção de ácidos nucleicos (DNA) do *Neospora caninum* pela técnica de PCR em amostras de tecidos de gerbil (*Meriones unguiculatus*) submetidos infecção crônica/persistente com inoculação de 5×10^4 taq/ml (Grupo A); 5×10^3 taq/ml (Grupo B) e 5×10^2 taq/ml (Grupo C).

Animais	Eutanasia (dias)	Tecidos analisados						Total
		Medula	Coração	Pulmão	Baço	Fígado	Rim	
Grupo A:								
1	9*	-	-	+	+	+	+	4/6
2	9*	-	-	+	+	-	+	3/6
3	9*	-	-	+	+	+	+	4/6
4	10*	-	-	+	+	-	+	3/6
5	11	-	+	+	+	-	+	4/6
6	58	-	-	-	-	-	-	0/6
7	60	-	-	-	-	-	-	0/6
8	60	-	-	-	-	-	-	0/6
9	60	-	-	-	-	-	-	0/6
Total		0/9	1/9	5/9	5/9	2/9	5/9	
Grupo B:								
11	7*	-	-	+	+	+	+	4/6
12	8*	-	-	-	+	+	+	3/6
13	18	-	+	+	-	-	+	3/6
14	60	-	-	-	-	-	-	0/6
15	60	-	-	-	-	-	-	0/6
16	60	-	-	-	-	-	-	0/6
17	60	-	-	-	-	-	-	0/6
18	60	-	-	-	-	-	-	0/6
Total		0/8	1/8	2/8	2/8	2/8	3/8	
Grupo C								
21	12*	-	-	+	+	+	+	4/6
22	13*	-	-	+	-	-	+	2/6
23	13*	-	-	-	+	-	+	2/6
24	40*	-	-	-	-	-	-	0/6
25	40*	-	-	-	-	-	-	0/6
26	60	-	-	-	-	-	-	0/6
27	60	-	-	-	-	-	-	0/6
28	60	-	-	-	-	-	-	0/6
29	60	-	-	-	-	-	-	0/6
30	60	-	-	-	-	-	-	0/6
Total		0/10	0/10	2/10	2/10	1/10	3/10	

*Morte espontânea.

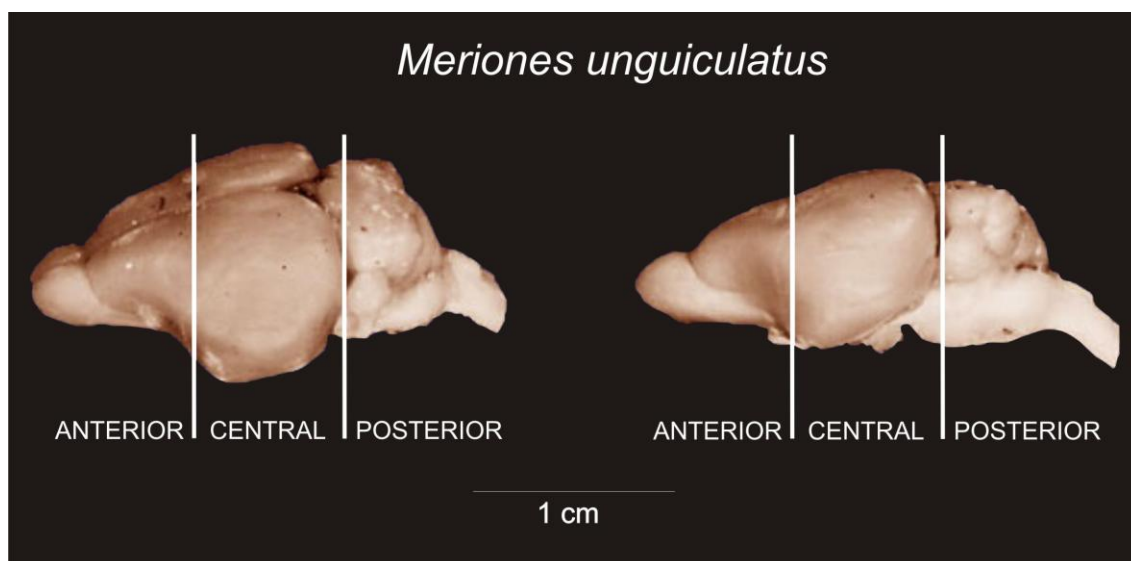
ANEXO 1:

Figura 1: Imagem representativa do local de secção do cérebro de um Gerbil (*Meriones unguiculatus*) para a obtenção das regiões utilizada neste estudo.

4. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho podemos concluir que:

1. A utilização de gerbils (*Meriones unguiculatus*) como modelos experimentais pode viabilizar pesquisas com o *Neospora caninum*, revelando características do agente que, futuramente, podem ser aplicados em bovinos.
2. Os gerbils demonstraram ser capazes de reproduzir a infecção aguda e crônica pelo *N. caninum*, evidenciando ser uma espécie com elevada sensibilidade que pode atuar como ferramenta para métodos de controle e diagnóstico
3. A detecção de ácidos nucleicos de *N. caninum* é reflexo, também, da carga parasitária aplicada e sensibilidade da técnica aplicada.
4. A utilização da técnica qRT-PCR para a detecção de DNA de *N. caninum* foi importante para o diagnóstico da infecção crônica por este protozoário.
5. O SNC demonstrou, mais uma vez, ser o principal tecido que o protozoário permanece em estado de latência e onde a detecção do *N. caninum* depende de técnicas bastante sensíveis.

5. REFERÊNCIAS

AGUADO-MARTÍNEZ A., et al., Stage-specific expression of NcSAG4 as a marker of chronic *Neospora caninum* infection in a mouse model, **Parasitology**. v.136, p.757-764, 2009.

ANDERSON M.L., et al., Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**. v.60-61, p.417-431, 2000.

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

COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiologic**. v.4, p.1194-1198, 2002.

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

DUBEY J.P., et al. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal Parasitology**. v.32, p.99-105, 2002.

DUBEY J.P. Neosporosis in cattle. **Veterinary Clinics of North Americam: Food Animal Practice**. v.21, p.473-483, 2005.

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

DUBEY J.P. et al., Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum* **Veterinary Parasitology**. v.181, p.382– 387, 2011.

ENTRICAN G., Immune control during pregnancy and host–pathogen interactions in infectious abortion. **Journal Comparative Pathology**. v.126, p.79–94, 2002.

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.

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., Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Journal Parasitology**. v.34, p.159-161, 2004.

HEMPHILL, A. et al., The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1175-1188, 1999.

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

LIDDELL, S. et al., Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. **Journal Parasitology**. v.85, p.550–555, 1999.

LONG, M. et al. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **Journal Parasitology** v.84, p.316-320, 1998.

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

MCGUIRE, A.M., et al., A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. **Journal Parasitology**. v.83, 647-651, 1997.

KAUFMANN, S.H.E & STEWARD, M.W. **Topley & Wilson`s: Microbiology and Microbial Infections**. Holdder Arnord: whashington, 2005. 10v.

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.