

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
INTEGRADA À MEDICINA VETERINÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO
REGIONAL

KEZIAH MELO DE SANT'ANA

Dinâmica da infecção natural por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em caprinos

Viçosa
2018

KEZIAH MELO DE SANT'ANA

Dinâmica da infecção natural por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em caprinos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação e Tecnologia Empregada à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto.

Viçosa
2018

Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Pólo Viçosa
Bibliotecária Responsável: Edvânia C. S. Gonçalves

S231d Sant'Ana, Keziah Melo de

Dinâmica da infecção natural por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em caprinos/ Keziah Melo de Sant'Ana – 2018.
68f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Alagoas, *Campus* Arapiraca, Pólo Viçosa, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Wagnner José Nascimento Porto

Inclui bibliografia

1. Neosporose 2. Toxoplasmose 3. Caprinos I. Título

CDU: 636.39

Folha de Aprovação

KEZIAH MELO DE SANT' ANA

Dinâmica da infecção natural por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em caprinos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Inovação e Tecnologia Empregada à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 28 de setembro de 2018.



Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto

Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Flaviana Santos Wanderley

Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas



Prof.Dra. Annelise Castanha Barreto Tenório Nunes

Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

A Deus, aos meus pais e aos meus amigos
por toda paciência, compreensão e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me ajudou em cada etapa desse trabalho e não me deixou fraquejar.

A minha família, por te me dado suporte e amor, para a conclusão deste trabalho.

A minha amiga de sempre Mariane Brandão, pelo estímulo, carinho e apoio aos muitos momentos de dificuldade, obrigada por sua amizade.

Ao meu orientador, professor Dr. Wagnner José Nascimento Porto, por toda ajuda e tempo oferecido, pelo acolhimento nos momentos de dúvidas experimentais e não experimentais. Cuja postura e dedicação são exemplos a serem seguidos.

Amigos que fiz desde o começo do mestrado em Viçosa, em especial as colegas de casa Flávia Argôlo e Taíne Soares, pela paciência e colaboração; amigos que fiz no decorrer do curso, obrigada Melissa Mendonça pela amizade, que vai muito além da Universidade e minha colega e companheira da pós-graduação Luiza Frassy, por ser minha dupla, minha professora de inglês, companheira e ouvinte de viagem, amiga de todas as horas e momentos; a amizade de vocês foi extremamente fundamental para a conclusão desse trabalho; tornaram momentos simples em inesquecíveis, e estenderam a mão nas situações necessárias.

Ao Nilson Tenório e sua família, proprietário da fazenda, que me cedeu o espaço para a pesquisa e por toda sua hospitalidade e de seus funcionários.

Aos meus colegas e ajudantes nos dias de coletas em Jatobá, em especial Franklin, Camila, Laura, Viviane, Heloísa, Pomy, Ana Clécia e Tony; obrigada pelo empenho e por toda ajuda.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, junto ao professor Dr. Rinaldo Mota e alunos de mestrado e doutorado por terem me cedido espaço no laboratório de Bacterioses para processamento das amostras da pesquisa, especialmente aos amigos Muller Andrade e Gabriela Silva, por toda ajuda, disponibilidade e acolhimento, espero um dia poder retribuir.

A todos meu muito obrigada por cada gesto de ajuda e colaboração....Eternamente grata!!!

RESUMO

A neosporose e toxoplasmose estão entre as principais causas de perdas econômicas na indústria pecuária de ruminantes. Diferentes estudos sorológicos têm demonstrado prevalências da infecção por *N. caninum* semelhantes ou superiores às aquelas determinadas por *T. gondii*, o protozoário classicamente relacionado com falhas reprodutivas em ovinos e caprinos. A realização de infecções experimentais em ovelhas e cabras gestantes tem demonstrado a elevada suscetibilidade destes animais à Neosporose e ao aborto. Contudo, o conjunto de estudos é muito limitado e não esclarecem as repercussões econômicas, clínicas e epidemiológicas da infecção por *N. caninum* em distúrbios reprodutivos nesses animais. O presente estudo objetivou estudar a dinâmica da infecção natural por *N. caninum* e *T. gondii* em caprinos naturalmente infectados durante seis meses em uma fazenda no sertão de Pernambuco. No total, foram testados sorologicamente (ELISA) 287 caprinos fêmeas, em idade reprodutiva e através dos resultados obtidos, 73 destas fizeram parte do grupo experimental que foi separado da seguinte maneira: G1, composto por 13 animais, infectados por *T. gondii*; G2, composto por 13 animais infectados por *N. caninum*, G3 composto por 13 animais infectados por *T. gondii* e *N. caninum*, G4 composto por 34 animais que não estavam infectados (grupo controle). A prevalência inicial para ambos os agentes na propriedade foi de 35,62% (26/73) e a falta de profilaxia e medidas de controle geraram, após seis meses, uma incidência de 76,6% para o *N. caninum* e 27,66% para *T. gondii* no rebanho. A soroprevalência descrita na área de estudo demonstra de forma indireta a circulação dos agentes principalmente pela via de transmissão horizontal no rebanho caprino.

Palavras-chave: Neosporose. Toxoplasmose. Caprinos.

ABSTRACT

Neosporosis and toxoplasmosis are among the leading causes of economic loss in the ruminant livestock industry. Different serological studies have demonstrated prevalences of *N. caninum* infection similar to or higher than those determined by *T. gondii*, the protozoan classically related to reproductive failures in sheep and goats. The performance of experimental infections in pregnant ewes and goats has demonstrated the high susceptibility of these animals to Neosporosis and to abortion. However, the range of studies is very limited and do not clarify the economic, clinical and epidemiological repercussions of *N. caninum* infection on reproductive disorders in these animals. The present study aimed to verify *N. caninum* and *T. gondii* natural infection dynamics in naturally infected goats during six months in a farm in the semi-arid of Pernambuco. In total, 287 female goats were tested serologically (ELISA), at reproductive age and through the results obtained 73 of them were part of the experimental group, which was separated as follows: G1, composed of 13 animals, infected by *T. gondii*; G2, consisting of 13 animals infected by *N. caninum*, G3 composed of 13 animals infected by *T. gondii* and *N. caninum*, G4 composed of 34 animals that were not infected (control group). The initial prevalence for both agents on the property was 35,62% (26/73) and the lack of prophylaxis and control measures increased the incidence up to 76,6% for *N. caninum* and 27, 66% for *T. gondii* in the herd, after six months. The seroprevalence described in the study area indirectly demonstrates the agents circulation mainly by horizontal transmission in the goat herd.

KeyWord: Neosporosis. Toxoplasmosis. Goats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Ciclo de vida do <i>Nesospora caninum</i>	16
FIGURA 2 -	Formas evolutivas <i>Toxoplasma gondii</i> (Micrografia Eletrônica). A= oocisto imaturo (massa central – esporonte, ocupando a maior parte do oocisto); B = oocisto esporulado com dois esporocistos (as setas indicam os quatro esporozoítos visíveis em um esporocisto), C = oocisto apresentando uma fina parede (seta grande), dois esporocistos (cabeças de setas) e esporozoítos, corte longitudinalmente (pequenas setas); D = taquizoíto da cepa VEG em uma célula de exsudato peritoneal de camundongo; E = cisto tecidual cerebral de um camundongo (seta indica parede do cisto envolvendo centenas de bradizoítos).....	31
FIGURA 3 -	Ciclo de vida completo do <i>Toxoplasma gondii</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcento
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
IFAT	Teste de Imunofluorescência Indireta
IFN	Intérferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IRPC	Índice Relativo Por Cento
ITS1	Espaçador Interno Transcrito -1
M	Mol
ml	Mililitro
NAT	Teste de Aglutinação de <i>Neospora</i>
NK	Natural Killers
ON	Óxido Nítrico
OD	Densidade Óptica
pH	potencial Hidrogeniônico
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RIPC	Índice Relativo Porcento
RPM	Rotações por minuto
SMF	Células do Sistema Mononuclear Fagocitário
Th	Células T helper
TGF	Fator de Crescimento Transformador
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 NEOSPOROSE.....	11
2.1.1 Histórico.....	11
2.1.2 <i>Neospora caninum</i>	12
2.1.3 Morfologia e Ciclo de Vida.....	13
2.1.4 Infecção em Caprinos.....	16
2.1.5 Aspectos Imunológicos.....	17
2.1.6 Imunologia da Gestação.....	19
2.1.7 Diagnóstico Laboratorial.....	21
2.1.7.1 Diagnóstico Parasitológico.....	22
2.1.7.2 Diagnóstico Sorológico.....	23
2.1.8 Controle e Tratamento.....	25
2.2 TOXOPLASMOSE.....	26
2.2.1 Histórico.....	26
2.2.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	27
2.2.3 Morfologia e Ciclo de Vida.....	29
2.2.4 Aspectos Imunológicos.....	33
2.2.5 Diagnóstico Laboratorial.....	36
2.2.5.1 Diagnóstico Parasitológico.....	36
2.2.5.2 Diagnóstico Sorológico.....	37
2.2.6 Controle e Tratamento.....	38
3 ARTIGO SUBMETIDO	40
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS.....	64
ANEXO A – Comprovante de Submissão.....	64
ANEXO B – Regras da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....	65

1 INTRODUÇÃO

Presente em quase todos os continentes do mundo, a produção de caprinos vem conquistando destaque comercialmente nos países subdesenvolvidos (MARTINS et al., 2014). No Brasil a caprinocultura passou a ser uma atividade em plena ascensão e de grande importância, visto que os caprinos são fontes de carne, leite e couro para os seres humanos (SAMPAIO et al., 2009; SILVA; BRANDÃO; FERREIRA, 2013).

As raças caprinas nativas do Brasil estão localizadas no Nordeste, onde os animais são criados em sistemas extensivo e semiextensivo. São animais bem adaptados e resistentes a doenças e parasitas (MENEZES et al., 2006), mas ultimamente o desenvolvimento da caprinocultura na região Nordeste tem sido afetado por inúmeros fatores, entre eles a alta incidência de doenças, influenciado pelo manejo sanitário em criatórios, promovendo alta mortalidade de animais, principalmente dos jovens (PINHEIRO et al., 2000). Em estudo realizado por Alencar et al. (2010) no sertão de Pernambuco, o mesmo também destaca que a deficiência tanto da sanidade quanto também das tecnologias disponíveis impossibilita o controle de doenças principalmente as de origem infecciosa e parasitária que interferem na produtividade.

O protozoário que tradicionalmente está associado ao aborto em caprinos e ovinos é *Toxoplasma gondii*, capaz de infectar animais homeotérmicos, incluindo também o homem (DUBEY, 2009), sendo considerado a maior causa de problemas reprodutivos na espécie ovina (UNDERWOOD; ROOK, 1992). Munday e Mason (1979) foram os primeiros a descreverem a toxoplasmose como importante causa de prejuízos reprodutivos também em caprinos, e apesar de pouco documentada nesta espécie, aparentemente os danos são maiores, acometendo clinicamente também em animais adultos (DUBEY, 1987).

Por outro lado, a importância do *N. caninum* na espécie caprina permanece incerta (MORENO et al., 2012), mesmo com a produção de distintos trabalhos de infecção experimental com *N. caninum* em cabras, demonstrando a ocorrência de abortamento, natimortos ou nascimento de cabritos clinicamente saudáveis em distintos períodos da gestação, porém ainda não está claro a real consequência da infecção natural por este coccídio como agente abortivo (PORTO et al., 2016).

N. caninum e *T. gondii* são parasitos apicomplexos formadores de cistos e

estritamente relacionados do ponto de vista filogenético (DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2009). A transmissão tanto pode ocorrer pela via horizontal (infecção pós-natal), quando o hospedeiro intermediário é infectado pela ingestão de oocistos esporulados, como pela via vertical transplacentária, que ocorre de uma fêmea infectada para sua prole, sendo esta a mais relevante (infecção congênita) (DUBEY; SCHARES et al., 2011). A transmissão transplacentária endógena (recrudescência de uma infecção crônica) é uma das principais rotas de infecção por neosporose, e estudos têm demonstrado altas taxas de bezerros congenitamente infectados, que podem nascer saudáveis e transmitir o parasito para a próxima geração (HIETALA; THURMOND, 1999; DAVISON; OTTER; TREES, 1999).

Para entender com mais detalhes a dinâmica da infecção natural por *N. caninum* e *T. gondii* na espécie caprina é importante realizar outros estudos com o objetivo de acrescentar novos dados epidemiológicos e detalhes da patogenicidade/capacidade de transmissão dos agentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEOSPOROSE

2.1.1 Histórico

No ano de 1984, na Noruega, Bjerkas, Mohn e Presthus, conseguiram identificar um protozoário que era semelhante ao *Toxoplasma gondii* em cães da raça Boxer, estes apresentavam sintomatologia nervosa e lesões inflamatórias extensas em todas as partes do sistema nervoso central (SNC) e nos músculos esqueléticos, porém não houve a detecção de anticorpos contra este parasito.

Em 1988, Dubey e colaboradores realizaram um estudo retrospectivo no qual 23 cães foram diagnosticados com toxoplamosse fatal no Hospital Animal Angell Memorial. Neste estudo em 10 destes cães foi identificado o *N. caninum*, parasita recém-descoberto pelo pesquisador, pertencente a um novo gênero e espécie que foi localizado diretamente no citoplasma da célula hospedeira sem o vacúolo parasitário. Meningoencefalomielite e miosite foram as principais lesões associadas ao *N. caninum*. No ensaio de imunoperoxidase não reagiram com o soro anti-*T. gondii*. Houve no mesmo ano o primeiro isolamento do parasita e desenvolvimento

da técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos séricos.

Dubey, Acland e Hamir, (1992) também demonstraram em seu estudo experimental com três vacas, que o *N. caninum* pode ser transmitido po via transplacentária entre bovinos, através dos achados de lesões teciduais nos fetos associadas ao parasito, tais como necrose multifocal e infecção não supurativa além da ocorrência de abortos ocasionados em vacas sem sintomatologia.

O primeiro hospedeiro defininitivo para neosporose só foi descoberto em 1998, com base nos estudos de McAllister e colaboradores, no qual os cães são um dos hospedeiros definitivos do *N. caninum*.

Recentemente Gondim et al. (2004), observaram que os coiotes (*Canis latrans*) também eliminavam oocistos pelas fezes sendo os primeiros canídeos selvagens confirmados como hospedeiros definitivos desse agente. Este estudo foi realizado com quatro filhotes de coiotes criados em cativeiro, onde os mesmos consumiam tecidos de bezerros infectados com *N. caninum*. Após quatro dias suas fezes eram analisadas.

Segundo Dubey e Lindsay (1996) a infecção natural do parasita tem sido identificada em vários outros ruminantes incluindo caprinos, ovinos. Mais recentemente em búfalos de água (DUBEY, 2003). Ainda não está totalmente claro se as descrições originais de neosporose em cavalos foram causadas por *N. caninum* ou pelo recentemente descrito *Neospora hughesi*, ambos do mesmo gênero (MARSH et al., 1998).

2.1.2 *Neospora caninum*

A Neosporose é uma doença causada pelo protozoário *N. caninum* e está amplamente disseminada em espécies domésticas e selvagens. A preocupação com esta protozoose é principalmente devido ao grande número de abortos em rebanhos bovinos e a doença neurológica, muitas vezes fatal em cães (MATTOS, 2009).

O *N. caninum* é um parasita intracelular obrigatório, sendo este um protozoário do filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e pertencente à família Sarcocystidae (DUBEY et al., 2002, MENDONÇA et al., 2013). Embora o *N. caninum* seja um protozoário muito semelhante com o *T. gondii*, este apresenta características distintas em relação a sua estrutura antigênica,

imunogênica e patogênica relacionada com o hospedeiro (DUBEY, 1999). Outros parasitas coccídios como o *Sarcocystis cruzi*, *Hammondia hammondi*, *Hammondia pardalis* e *Hammondia heydorni* têm também estreita filogenia com o *N. caninum* (DUBEY et al., 1988).

A neosporose afeta uma grande variedade de animais de sangue quente. Os canídeos domésticos e selvagens são os hospedeiros definitivos do parasita e os bovinos, ovinos, caprinos, equinos e cães os hospedeiros intermediários. Foram encontrados anticorpos para *N. caninum* no soro de búfalos de água, raposas vermelhas, cinzas e do campo (NASCIMENTO et al., 2015), coiotes, camêlos e em felinos. Os hospedeiros definitivos podem atuar também como hospedeiros intermediários do parasita, desenvolvendo um quadro de doença neuromuscular muitas vezes fatal (DUBEY, 2003). Estudos demonstram uma maior frequência de infecção por *N. caninum* em cães de áreas rurais em relação aos residentes em meio urbano, o que pode ser explicado pelo maior contato de animais que moram próximos a fazendas com carcaças e restos de fetos contaminados (WANHA et al.; 2005; HORNOK et al., 2006).

Os humanos não são considerados hospedeiros intermediários para *N. caninum*, mas seu potencial zoonótico é discutível, devido à proximidade filogenética com *T. gondii* e do relato de um estudo, onde fetos de primatas não humanos, Rhesus (*Macaca mulatta*) infectados artificialmente, apresentaram lesões semelhantes às causadas por toxoplasmose congênita (CUNHA, 2003); também há relatos de pessoas soropositivas para *N. caninum*, entretanto, os dados epidemiológicos são escassos e particularmente notificados em trabalhadores rurais em contato direto com animais soropositivos (MEIRELLES, 2014).

2.1.3 Morfologia e Ciclo de Vida

O *N. caninum* apresenta três formas de vida em seu ciclo: os taquizoítos e os cistos contendo bradizoítos, que podem ser encontrados nos tecidos dos hospedeiros intermediários, e os oocistos que são a forma de resistência excretados pelos hospedeiros definitivos após a fase sexuada de reprodução dos parasitas, estes são encontrados no ambiente (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Os cistos teciduais, presentes nos hospedeiros intermediários, são observados principalmente no tecido nervoso (como cérebro, medula espinhal,

nervos), músculos cardíacos e esqueléticos, fígado e músculos oculares (ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991; DUBEY; LINDSAY, 1996, LINDSAY et al., 1996). Nos cistos, os bradizoítos conservam sua capacidade infectante durante períodos de tempo prolongados e são resistentes à ação do ácido clorídrico (HCl) e à pepsina (DUBEY; LINDSAY, 1990).

O ciclo desse parasita (Figura 1) é alternado entre um hospedeiro intermediário, definido como o hospedeiro dos estágios assexuados (taquizoítos e bradizoítos), e um hospedeiro definitivo, que possui os estágios sexuados e também os assexuados (MACEDO, 1994). O cão pode comportar-se tanto como hospedeiro definitivo ou intermediário (GONDIM et al., 2004).

Os hospedeiros definitivos liberam os oocistos após a ingestão dos cistos teciduais, contendo bradizoítos, presentes nos hospedeiros intermediários infectados ou através da água e alimentos contaminados com oocistos que são fontes de infecção. A transmissão do hospedeiro definitivo também pode ocorrer por via transplacentária (DUBEY et al., 2002), porém há mais informações sobre a transmissão vertical em bovinos do que em cães, desconhecendo-se ainda se nos cães o *N. caninum* atua de forma similar, ou seja, se os abortos ocorrem caso a cadela se infecte durante a gestação e se há uma fase da gestação de maior importância, como nos ruminantes (INNES et al., 2001).

O número de oocistos eliminados pelos cães nas fezes é pequeno em comparação à quantidade eliminada de oocistos de *T. gondii* pelos gatos, mas os filhotes eliminam uma quantidade maior que um cão adulto (DUBEY et al., 2002; GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2005). Já com relação aos coiotes, estes são vistos até como hospedeiros definitivos relativamente ineficientes, por eliminar níveis baixos de oocistos após infecção experimental (GONDIM et al., 2004).

Os hospedeiros intermediários podem se infectar ao consumir água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados (WOUDA, et al., 1999). Silva e Machado (2016) concluíram dessa forma que a presença de cães nas propriedades rurais tende a ser considerado um fator de risco para os animais de produção através da transmissão horizontal.

Embora a transmissão horizontal tenha seu valor, principalmente nos bovinos, geralmente é aceito que a infecção congênita é o principal meio de transmissão e manutenção do parasita nos rebanhos (HIETALA; THURMOND, 1999).

Em caprinos naturalmente infectados, sabe-se que a transmissão

transplacentária também pode ocorrer, porém não há muitos detalhes da patologia (BARR et al., 1992; LINDSAY et al., 1995; DUBEY, 2003; ELENÍ et al., 2004).

Em um estudo experimental da neosporose em vacas gestantes foi analisada a importância da transmissão vertical com relação ao período da infecção e a produção de lesão nos fetos. A primoinfecção em fases precoces da gestação produz lesões inflamatórias intensas na placenta, morte e reabsorção fetal, e nas fases mais tardias da gestação, o feto produz uma resposta inflamatória de defesa diminuindo o impacto da infecção (INNÉS et al. 2001).

Como citado por McAllister et al. (1998) são também fontes de infecção os cistos ou taquizoítos encontrados nos fetos abortados, restos placentários e líquidos fetais, ou mesmo outros tecidos contaminados.

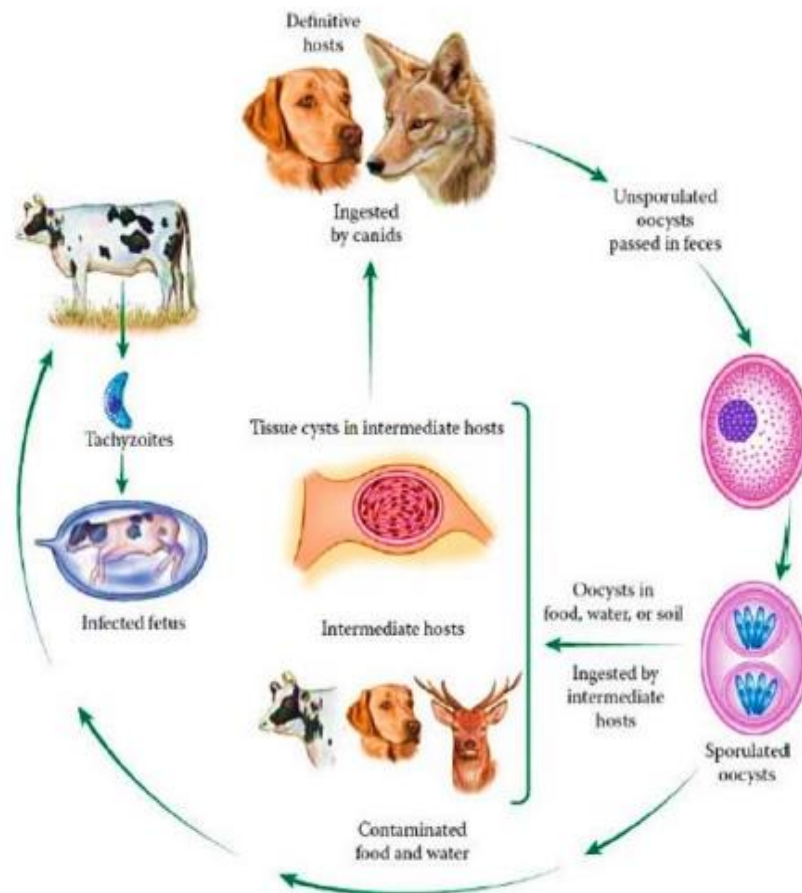
O ciclo intestinal do parasita, no hospedeiro definitivo ainda não foi descrito (GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2002); porém, pela semelhança com o *T. gondii*, acredita-se que a fase sexuada ocorra de fato no intestino dos hospedeiros definitivos que se infectam com os oocistos esporulados ou cistos contendo os bradizoítos, onde se dá a fase intestinal no hospedeiro (enteroepitelial), eliminando, assim, os oocistos não – esporulados nas fezes. Os oocistos das fezes dos cães, só esporulam após 24 a 72 horas no ambiente, tornando-se então, infectantes (esporulados). Os canídeos eliminam os oocistos por volta do quinto dia, após a ingestão de tecidos de animais naturalmente ou experimentalmente infectados. Morfologicamente os oocistos esporulados contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, com cerca de 10 a 11 μm (DUBEY 1988; DUBEY, 1999; MCALLISTER et al., 1998; GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2002;).

Quando os esporozoítos invadem as células da parede intestinal passam a se chamar taquizoítos, os quais se dividem rapidamente por endodiogenia e podem atingir quaisquer células do organismo do hospedeiro, causando severas lesões em vários órgãos (DUBEY, 1999). Os taquizoítos têm formato de arco e medem de 2 a 4 por 4 a 8 μm , estes entram em quaisquer células dos hospedeiros por penetração ativa ou fagocitose e a multiplicação por endodiogenia acontece dentro de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula. Quando a célula não suporta mais o crescimento dos taquizoítos, ela se rompe, e os mesmos invadem outras células vizinhas. Taquizoítos já foram observados em macrófagos, neutrófilos, células do tecido nervoso, hepatócitos, fibroblastos, miócitos, células epiteliais tubulares renais

e células endoteliais vasculares (SPEER et al., 1999; BLACK; BOOTROYD, 2000; MONTOYA; LESENFELD, 2004).

Com a resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, forma de multiplicação lenta contidas em cistos teciduais e uma queda da imunidade do hospedeiro pode provocar a reativação desses bradizoítos e rompimento do cisto (DUBEY, 1999).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Neospora caninum*.



Fonte: DUBEY et al., 2017.

2.1.4 Infecção em Caprinos

Os abortos causados por protozoários no rebanho ovino e caprino normalmente tem sido relacionados diretamente com a infecção por *T. gondii*, utilizando o diagnóstico anatomopatológico das lesões necróticas e inflamatórias características da infecção por este protozoário nos tecidos fetais, principalmente no

encéfalo. No entanto, as lesões histopatológicas produzidas por *N. caninum* e *T. gondii* no aborto ovino e caprino são indistinguíveis (BARR et al., 1992; MCALLISTER et al., 1996; BUXTON et al., 1997).

Em relação aos caprinos, ainda são poucos os estudos relacionados a infecção por *N. caninum*, entretanto há relatos na literatura de abortos e mortalidade neonatal em caprinos nos Estados Unidos da América (EUA) (BARR et al., 1992, DUBEY; ACLAND; HAMIR, 1992), na Itália (ELENI et al., 2004) e no Brasil, onde neste estudo Corbellini, Colodel e Driemer (2001), relataram o encontro do agente em um caprino, nascido com ataxia e opstótono. Os sinais nervosos tornaram-se mais severos 3 dias após o nascimento do mesmo, quando o animal foi sacrificado. Vários cistos de *N. caninum* foram observados no córtex cerebral e medula, e confirmado pela imuno-histoquímica, outras lesões também foram encontradas no coração, pulmão e fígado, entretanto taquizoítos do agente não foram observados.

Lindsay e colaboradores (1995) comprovaram em seu estudo que a inoculação de taquizoítos de *N. caninum* em cabras gestantes também produz aborto ou natimorto ou nascimento de cabritos clinicamente saudáveis, dependendo do tempo de inoculação do parasito durante a gestação. Desta forma, a inoculação de cabras “anãs” (cabras pigmeus) com taquizoítos de *N. caninum* no dia 51 de gestação (primeiro terço) produziu o aborto em todos os animais inoculados, enquanto que no dia 81 (segundo terço), resultou em um natimorto em um de dois animais inoculados. A inoculação de *N. caninum* aos 127 dias de gestação (terceiro terço) não teve efeitos clínicos na gestação, resultando no nascimento de cabritos clinicamente sadios.

A prevalência da neosporose em caprinos varia entre 0,4% (Polônia) 23,6% (Filipinas), com uma prevalência entre 1 e 19,7% no Brasil determinada mediante a técnica de RIFI e Imunoaglutinação (NAT), respectivamente (DUBEY; SCHARES, 2011).

2.1.5 Aspectos Imunológicos

Ambos os mecanismos da resposta imune celular inata quanto da adaptativa estão relacionados ao combate de *N. caninum* e estes são bem semelhantes aos de *T. gondii* (BUZONI-GATEL; WERTES, 2006).

A primeira barreira de defesa contra o agente é física, quando a infecção se dá por via oral, sendo representada por enterócitos e espessas junções intercelulares da mucosa intestinal, que tem como objetivo deter a invasão do parasito (BUZONI-GATEL; WERTES, 2006). Os enterócitos infectados secretam moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (ON) e citocinas como a IL-15, que induzem as células natural killer (NK) a produzir IFN- γ e quimiocinas, recrutando leucócitos polimorfonucleares, células dendríticas e macrófagos. (MARCAIS et al., 2013).

A resistência de protozoários como *N. caninum*, é dependente de respostas imunes mediadas por citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos T CD4+ tipo 1 (Th1), com a imunidade mediada por células, exercendo papel fundamental no controle da infecção (HEMPHILL et al., 1999; HUNTER; REINER, 2000).

Estudos *in vivo* demonstraram que camundongos que possuem certa deficiência para a interleucina 12 (IL-12) ou interferon gama (IFN- γ) são incapazes de resistir à infecção com *N. caninum* (INNES et al., 2002). Dessa forma, os dados indicam que a imunidade protetora do hospedeiro induzida pela infecção por *N. caninum*, assim como de outros agentes intracelulares, é tipicamente mediada por um padrão de resposta imune do tipo Th1, que envolve a produção de IFN- γ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , juntamente com a produção de óxido nítrico (ON) (DONAHOE et al., 2015; HECKER et al., 2015).

A participação efetiva das diferentes classes de imunoglobulinas e a cinética durante a resposta imune à infecção por *N. caninum* ainda é pouco compreendida, principalmente em animais naturalmente infectados. Acredita-se que os anticorpos tenham um papel auxiliar no controle da infecção, participando da neutralização e destruição dos taquizoítos extracelulares, podendo, assim, reduzir a disseminação do agente (INNES et al., 2002). Entretanto, a ausência de linfócitos B em camundongos geneticamente deficientes leva a uma falha no controle da infecção, indicando que os anticorpos possam ter papel relevante no controle da infecção (EPERON et al., 1999; AMMANN et al., 2004).

As primeiras imunoglobulinas produzidas são IgM e IgD, que sofrem uma mudança de classe para IgG, IgE e IgA nessa ordem, sendo que as IgGs são as produzidas em maior quantidade (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Das espécies estudadas, os cães apresentam uma cinética tardia de resposta mediada por anticorpos da classe IgG, já as demais espécies mantêm

níveis séricos por curto período de tempo (COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006). Os bovinos, exceção a este fenômeno, geralmente apresentam uma rápida soroconversão, com altos títulos, e tendem a manutenção de positividade durante um longo período (DIJKSTRA et al., 2003), estima-se que, os anticorpos IgM atinjam seu pico máximo com duas semanas, diminuindo após quatro semanas na infecção. As concentrações de IgG se mantêm elevadas por três a seis meses, mas persistem em menores níveis por toda a vida do hospedeiro (GUIDO et al., 2016).

2.1.6 Imunologia da Gestação

A situação imunológica encontrada durante a gestação é um desequilíbrio na interação hospedeiro-parasita, o que pode explicar a patogenia da doença. A resposta imune contra a infecção vai influenciar no sucesso da gestação, visto que a imunomodulação que ocorre durante esse período pode afetar a habilidade da gestante para enfrentar a infecção (SILVA, 2005).

A prenhez é um evento único e complexo nos mamíferos e nele envolve uma série de mecanismos regulatórios por parte do sistema imune da mãe e do feto, já que o mesmo pode ser considerado um aloenxerto, por possuir determinantes antigênicos tanto da mãe quanto do pai. Vários mecanismos relacionados ao sucesso da não rejeição do feto são hoje conhecidos. Porém, estes fatores podem entrar em situação de risco, quando há agentes infecciosos na placenta, como *N. caninum*, que podem causar danos ao sistema de tolerância da gestação (ENTRICAN, 2002).

Estudos correlacionam a participação de citocinas na polarização da resposta imune por células T auxiliares do tipo 1 (Th1), com produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), como fator desencadeante de eventos humorais e celulares específicos que causariam lesões, as quais poderiam levar ao aborto (ORLANDO, 2017). Além destas lesões induzidas na placenta, a resposta também é capaz de prejudicar a distribuição vascular de nutrientes favorecendo, ainda mais, a ocorrência de aborto (CANTÓN et al., 2014). Porém, durante o período gestacional, há uma modulação da resposta imune, levando à expressão de citocinas para um padrão Th2 nos linfócitos T CD4+, sendo este perfil induzido principalmente pelos altos níveis de progesterona mantidos durante a gestação (INNES et al., 2002). O aumento do nível de progesterona produzido pela

placenta com a evolução da gestação, principalmente no segundo terço para o final, gera aumento no título de anticorpos no decorrer de todo período gestacional (SENGER, 2005; GARCIA-ISPIERTO et al., 2010). A progesterona desvia a resposta imune celular para humoral, levando a um *down regulation* na resposta por IFN- γ , o que favorece a recrudescência do *N. caninum* (INNES et al., 2005).

É descrito aumento nos títulos de anticorpos, quatro a cinco meses antes do parto em bovinos (DUBEY, 2003) e, a partir do terceiro mês de gestação em caprinos (MESQUITA et al., 2013), sugerindo que ocorra reativação de uma infecção latente (DUBEY, 2003).

Dessa forma, o sistema imune da fêmea é induzido a optar entre o comprometimento da gestação pela resposta imune ao parasito ou ao empenho na manutenção da gestação, que leva à consequente reativação do agente (QUINN; ELLIS; SMITH, 2002). A concomitância entre a gestação, caracterizada imunologicamente pelo aumento da produção das citocinas IL-4 e IL-10, associada a infecções agudas ou crônicas por *N. caninum*, leva a uma replicação descontrolada do parasito, seguidos de efeitos deletérios para o feto (MONNEY; HEMPHILL, 2014; DONAHOE et al., 2015). Assim, uma resposta imune de perfil misto parece ser crucial no controle da infecção e na manutenção da gestação (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2016),

Existem outras causas que influenciam o resultado da infecção por *N. caninum* em animais prenhes. Dentro destes fatores são incluídos: quantidade e duração da parasitemia (INNES et al., 2000); espécie animal infectada (ARRANZ-SOLÍS et al., 2016); rota de infecção (MACALDOWIE et al., 2004); estirpe do parasita (algumas cepas são mais patogênicas que outras); grande variedade de antígenos, sendo alguns responsáveis pela modulação de uma resposta imune protetora para o hospedeiro, enquanto outros possuem o efeito oposto, favorecendo a invasão pelo parasito e causando danos ao hospedeiro (HEMPHILL et al., 2013); o estado imunológico da mãe e idade gestacional do feto no momento da infecção também influenciam (INNES et al., 2000)

O estágio da gestação em que ocorre a infecção ou o recrudescimento das formas bradizoítas, que se reflete no nível de anticorpos, é um dos fatores que define o futuro da gestação. As consequências da infecção/recrudescência do *N. caninum* para o feto são mais severas no início da gestação, já o risco de transmissão transplacentária aumenta com o avançar da idade gestacional. A

resposta por anticorpos contra *N. caninum* é uma ótima ferramenta para diagnóstico e estudos epidemiológicos. O título de anticorpos é um indicador indireto da exposição do sistema imune a antígenos do protozoário. Um aumento no título de anticorpos pode indicar reativação e multiplicação do *N. caninum*. Neste sentido, o aumento no título de anticorpos em fêmeas portadoras, durante a gestação, pode ser reflexo da reativação do protozoário. (ANTONELLO et al., 2015; WILLIAMS; WOUDA, 2000; MACALDOWIE et al., 2004).

Nas cabras e em outros ruminantes, não existe a transferência pré-natal de imunoglobulina através da placenta. Devido a isso, os anticorpos específicos do parasita que são detectáveis em soros pré-colostrais provavelmente foram sintetizados no pré-natal pelo feto, indicando uma resposta imune ativa contra o parasita invasor (STAUBLI et al., 2006). Em modelos de estudo da gestação de vacas infectadas por *N. caninum*, a ocorrência de aborto é dependente da idade gestacional em que ocorreu a infecção fetal. A presença de *N. caninum* na placenta é capaz de induzir forte resposta Th1 materna, no terço inicial da gestação, o que acaba levando ao aborto (MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2007). Porém, quando a infecção ocorreu mais tardiamente, o índice de aborto foi menor e não se percebeu a polarização acentuada entre as respostas Th1 ou Th2, pois o perfil Th1 ou Th2 já não é tão importante para manutenção da gestação em um momento mais tardio, pois houve uma polarização no início da gestação (ROSBOTTOM et al., 2007).

2.1.7 Diagnóstico Laboratorial

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

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado laboratorialmente por detecção direta do protozoário em amostras biológica por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), isolamento parasitário e imuno-histoquímica ou por detecção indireta através da utilização da sorologia, onde anticorpos específicos contra proteínas dos protozoários são encontrados em técnicas de imunoensaios como

ELISA, soroaglutinação, Western Blot e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (MACÊDO JÚNIOR, 2013).

2.1.7.1 Diagnóstico Parasitológico

Os métodos parasitológicos utilizados no diagnóstico e pesquisa de *Neospora sp.* são os exames histopatológico, imuno-histoquímico, o isolamento *in vitro* e *in vivo*, a detecção do DNA do parasita por PCR (reação em cadeia da polimerase), a observação dos cistos nos tecidos à fresco e o exame de fezes dos cães (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 2000; PETERS et al., 2001;).

A confirmação de *Neospora sp.* como causa de aborto deverá ser realizada através da associação do isolamento do protozoário e a observação de lesões patológicas características (DUBEY, 2003). Os exames histopatológico, imuno-histoquímico e o método da PCR são os mais utilizados para o diagnóstico de aborto nos ruminantes por *N. caninum*. A associação dessas técnicas de diagnóstico com informações referentes ao histórico do rebanho e sorologia da mãe aumenta a probabilidade de detectar a infecção por *N. caninum* nos fetos (EMBRAPA, 2003).

Exames histológicos podem confirmar a neosporose em fetos abortados pela visualização das lesões características causadas pelo protozoário. Os órgãos geralmente utilizados neste diagnóstico são cérebro, placenta, fígado e coração (DUBEY; SCHARES, 2006), porém esta técnica precisa da confirmação da presença do protozoário pela imuno-histoquímica ou PCR, pois outros parasitas podem causar lesões semelhantes (CABRAL et al., 2009; DUBEY; SCHARES, 2011).

A imunohistoquímica é uma técnica relativamente pouco sensível para detectar o protozoário em tecidos do hospedeiro devido ao baixo número de parasitas presentes, e algumas vezes, à baixa qualidade do tecido fetal, que pode estar autolisado, mumificado ou macerado (BASZLER et al., 1999; DUBEY, 1999). Baszler et al. (1999) constataram que a PCR usada para detectar DNA de *N. caninum* em tecidos de animais infectados tem uma alta sensibilidade quando comparado com técnicas imuno-histoquímicas, sendo assim uma boa alternativa. A grande vantagem da PCR é a possibilidade da identificação de pequenas quantidades do agente em grandes áreas teciduais; contudo, custo, tempo e equipamentos específicos, são fatores limitantes para uso desse procedimento (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000). Outra possibilidade para o

diagnóstico é o isolamento do agente em cultivo celular ou a partir de animais de laboratório (DUBEY et al., 1998).

Quando exames do soro materno, fluidos corporais fetais ou tecidos fetais são positivos ao *N. caninum* pela sorologia ou PCR, o aborto pode estar associado ao *N. caninum*, mas é importante relacionar outras causas potenciais. Se as lesões no cérebro e coração são graves e os taquizoítos de *N. caninum* estão presentes nas lesões, muito provavelmente a causa do aborto é devido à neosporose (DUBEY; SCHARES, 2006).

2.1.7.2 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico pesquisa os anticorpos direcionados aos antígenos de superfície dos taquizoítos de *N. caninum* no soro dos animais (PETERS et al., 2001). Os testes sorológicos mais utilizados são RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e ELISA (Ensaio Imunoenzimático), também podem ser utilizados o teste aglutinação de *Neospora* (NAT) e Western Blot (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 2000).

A presença de anticorpos séricos para *N. caninum* indica a exposição ao parasita ou a um parasita estritamente relacionado passível de reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa (VARDELEON et al., 2001).

A infecção por *N. caninum* estimula a resposta imune humoral do hospedeiro, sendo possível a detecção de anticorpos contra antígenos imunodominantes (HIASA et al., 2012) presentes na forma de taquizoíto ou bradizoíto, sendo possível estabelecer assim o estágio agudo ou crônico da infecção, porém, o início da infecção com base no exame sorológico ainda não é possível determinar (DUBEY; LINDSAY, 2006; MCALLISTER et al., 2000). Devido à resposta imunológica poder ser detectada através de testes sorológicos, os diagnósticos indiretos possuem grandes vantagens, como serem utilizados no *antemortem* dos animais e também por fornecerem informações quanto ao estágio da doença (HIASA et al., 2012; TAKASHIMA et al., 2013).

As principais limitações dos testes sorológicos são as diferentes metodologias, titulações e critérios de interpretação dos resultados entre os diferentes laboratórios. Outras limitações são as flutuações dos níveis de anticorpos

durante a vida do animal, pela característica de recrudescência da infecção (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

A utilização e interpretação dos exames sorológicos nos ruminantes devem ser feitas com cautela, principalmente no diagnóstico dos casos de aborto. O sorodiagnóstico é mais bem utilizado para avaliar a exposição e o risco de infecção por *N. caninum* de um rebanho, do que para o diagnóstico de aborto em um animal (BOGER; HATTEL, 2003).

As técnicas mais utilizadas para detectar a presença de anticorpos séricos específicos para *N. caninum* são: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e teste Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (ANDREOTTI et al., 2002), por serem relativamente mais baratos (ROMERO; PEREZ; FRANKENA, 2004).

O primeiro teste sorológico desenvolvido foi a Imunofluorescência Indireta em 1988 por Dubey (DUBEY; LINDSAY, 1996), esta é a técnica mais comumente usada, sendo considerada como o “padrão ouro” dos diagnósticos sorológicos apesar de ser um teste subjetivo (DUBEY; LINDSAY, 1996; REICHEL; PFEIFFER, 2002). A finalidade do método é a fixação de anticorpos aos antígenos de membrana dos taquizoítos, com visualização da reação pela adição de um conjugado fluorescente. Os anticorpos não específicos que produzem fluorescência reduzida e conseqüentemente reação cruzada são desconhecidos. *N. caninum* e *T. gondii* possuem muitos antígenos semelhantes, porém a RIFI parece ser bem específica na detecção dos anticorpos (DUBEY et al., 1998; DUBEY; LINDSAY, 1996).

O primeiro teste de ELISA padronizado foi descrito por Björkman et al. (1994). Desde então, várias tentativas de torná-lo mais sensível e específico têm sido feitas, incluindo modificações na forma de preparo do antígeno. Hoje existem testes de ELISA em que o antígeno empregado pode ser o taquizoíto inteiro (WILLIAMS et al., 1997), o taquizoíto sonicado e proteínas recombinantes (PARE; HIETALA; THURMOND, 1995). O ELISA vem sendo o principal método sorológico utilizado nas avaliações dos rebanhos de ruminantes, com finalidades diagnósticas ou de pesquisa, pois apresenta algumas vantagens em relação ao método da RIFI, dentre elas destacam-se a realização de um maior número de análises, maior rapidez, o registro das reações é feito de maneira objetiva e o exame pode ser automatizado (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

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

Ambos os testes NAT e ELISA, especialmente este último, podem ser mais recomendados para avaliação da presença do *N. caninum* em alguns casos, porque os mesmos são testes não espécie-específicos e, como o parasito possui diferentes espécies hospedeiras, esta vantagem se torna importante na avaliação da neosporose (WAPENAAR et al., 2007).

O Western Blot tem sido muito utilizado como teste confirmatório para *N. caninum* em muitas espécies animais, sendo considerado um teste que possui alta sensibilidade e especificidade. Quando se associa esta técnica aos métodos de RIFI ou ELISA, a prevalência da neosporose diminui, sugerindo que a infecção é menos comum quando comparado aos resultados dos demais testes sorológicos (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 2000).

2.1.8 Controle e Tratamento

Ainda não há um controle efetivo contra a neosporose devido à inexistência de uma vacina eficaz frente à doença. Existem indícios de que as vacinas inativadas produzem um efeito preventivo na transmissão vertical (mãe-filha), porém ainda não foi confirmada a eficiência na prevenção de abortos e os resultados ainda são inconclusivos (ANDRADE, 2011). Portanto o desafio de uma vacina eficaz para a neosporose está no impedimento da primoinfecção de animais e do recrudescimento da doença em animais positivos, evitando assim o aborto (REICHEL; ELLIS, 2009).

As medidas efetivas de controle são adequadas para evitar que a doença permaneça cronicamente no rebanho, o que pode acarretar várias consequências. Dentre as medidas de prevenção as mais indicadas são: fazer o uso somente de receptoras soronegativas, para realizar a transferência de embrião; evitar o acesso de cães a tecidos infectados como fetos abortados, fluídos e restos de placentas, bem como, o acesso aos comedouros e bebedouros, mantendo sempre os alimentos em lugares fechados, evitando assim a contaminação; uso de maternidades individuais. Além do controle de cães, é necessário o controle de roedores, (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Segundo Reichel e Ellis (2009), existem drogas experimentalmente eficazes contra o *N. caninum*. Porém, o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível, antes que os sinais clínicos se tornem irreversíveis, além de ser muitas vezes economicamente inviável.

Várias drogas, como decoquinato, depudecina, toltrazulrin, ponazuril, artemisinina e os extratos de ervas medicinais têm sido utilizados *in vitro* (cultivo celular) e *in vivo* (camundongos), porém, em bovinos não há ainda comprovação de sua eficácia (LINDSAY; BUTLER; BLAGBURN, 1997).

Coccidiostáticos como o toltrazuril apresentam efeitos desejáveis apenas em taquizoítos, não existindo evidências de seu efeito em bradizoítos (REICHEL; ELLIS, 2009). Outro grupo de quimioterápicos utilizados são as sulfas, como a sulfadiazina, que em estudos com camundongos tem mostrado eficiência de 90% no combate a *N. caninum* (DUBEY; LINDSAY, 1996).

2.2 TOXOPLASMOSE

2.2.1 Histórico

O protozoário *T. gondii* foi isolado em 1908, quase ao mesmo tempo e independentemente por Afonso Splendore, no Brasil, em um coelho que morreu com paralisia, e por Nicolle e Manceaux em células mononucleares do baço e fígado de um roedor africano, (*Ctenodactylus gundi*), no Instituto Pasteur da Tunísia, no norte da África; a descoberta foi feita acidentalmente enquanto procuravam por um reservatório de *Leishmania* em tecidos do roedor (DUBEY, 2010; SCHNELL, 2011).

Em 1909, Nicolle e Manceaux nomearam o parasita de *Toxoplasma gondii*, esta nomenclatura foi baseada na morfologia do microorganismo, pois *Toxoplasma* deriva do grego e significa “forma de arco”, como também no nome do roedor hospedeiro (SCHNELL, 2011).

Nos anos seguintes, vários investigadores encontraram em diversos animais, parasitas morfologicamente semelhantes ao *T. gondii*, que foram denominados de acordo com a espécie animal onde eram detectados: *T. canis*, *T. columbae*, *T. gallinarum*, *T. cuniculi*. Porém, os estudos realizados por Sabin em 1939 levou-o a concluir que se tratava de uma única espécie de protozoário (FREYRE, 1989; PIZZI, 1997).

Os primeiros relatos da doença em animais domésticos foram descritos em um cão, na Itália (1910); em um gato, nos EUA (1942); e em fetos ovinos abortados, na Nova Zelândia (1957) (DUBEY, 2008).

A descrição de infecção humana por este parasito foi realizada primeiramente por Jankü, em 1923, com o relato de um caso de uma criança falecida em Praga (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999). Torres et al., em 1927, descreveram no Rio de Janeiro a presença de microrganismos que identificaram como *Toxoplasma*, em cortes histológicos de cérebro, miocárdio e músculo esquelético de um recém nascido falecido no 29º dia de vida (GUIMARÃES, 1943).

Jacobs, Remington e Melton relataram em 1960, a primeira demonstração da presença de cistos do *T. gondii* na carne de animais, dando considerável suporte a hipótese de que o homem poderia adquirir a infecção pelo consumo de carne mal cozida. Apenas as formas de vida assexuadas tinham sido elucidadas pelos pesquisadores, daí foi em 1970, que o seu ciclo biológico completo foi descoberto, com felinos como hospedeiros definitivos, contendo as formas sexuadas no intestino delgado, e um estágio ambiental resistente (oocisto) excretado nas fezes de gatos infectados (DUBEY, 2008, 2009). Nos anos de 1975-1976, foi descrito o ciclo selvático do parasito, evidenciando que não só os felinos domésticos eram os responsáveis pela perpetuação do protozoário (PIZZI, 1997).

2.2.2 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose, conhecida popularmente como “doença do gato”, é causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário que acomete uma infinidade de espécies, incluindo os mamíferos, répteis, anfíbios e aves. Sendo considerada uma das parasitoses mais frequentes no homem e nos animais homeotérmicos (NAVARRO, 2001).

A doença tem significativa importância médica, especialmente em pessoas imunocomprometidas e gestantes, que constituem os principais grupos de risco em humanos, e cuja infecção pode resultar em severas consequências. Mais de 50% da população humana mundial acha-se infectada por esse protozoário com variações determinadas por fatores climáticos, sócio econômicos, tipo de contato com animais, em especial o gato e costumes alimentares relacionados ao consumo de carnes (SCHNELL, 2011; MACIEL; ARAÚJO, 2004).

Nos animais, adquire importância, principalmente porque quando esses são infectados servem de fonte direta ou indireta de infecção ao homem, além de causar danos diretos aos animais de interesse econômico e de estimação. O parasita se deposita na musculatura e pode infectar o homem pela ingestão de carne crua ou mal cozida (OLIVEIRA; COSTA; SABATINI, 2001).

Os felídeos, notadamente os gatos, desempenham papel fundamental na transmissão do *T. gondii* (LANGONI; SILVA; CABRAL, 2001), pois são o ponto chave da epidemiologia da toxoplasmose, sendo os únicos hospedeiros definitivos do parasito e transmissores de forma sexuada. Estes eliminam os oocistos pelas fezes, sendo a única fonte de infecção dos animais herbívoros. (DAGUER et al., 2004).

O *T. gondii* é um protozoário pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma*, espécie *Toxoplasma gondii* (KAWAZOE, 2005). É um eucarionte estruturalmente formado por uma membrana externa, anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, roptrias, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de golgi, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, microporo e um núcleo com parede bem definida (METSIS; PETERSEN, 1995).

Róptrias, micronemas e grânulos densos estão envolvidos no processo de adesão, invasão e sobrevivência do parasita na célula hospedeira (DE SOUZA; SOUTO-PADRÓN, 1978) *T. gondii*, assim como outros parasitos do filo Apicomplexa, invade a célula alvo através de mecanismo ativo, diferentemente da forma de invasão da maioria dos microorganismos intracelulares, este penetra ativamente na célula do hospedeiro (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2012). Após o mecanismo de invasão, o parasita se estabelece e se desenvolve dentro de um vacúolo modificado, formado no interior da célula hospedeira, denominado vacúolo parasitóforo (VP) (DUBREMETZ et al., 1998).

Em algumas circunstâncias, a toxoplasmose pode ocorrer em graus variáveis de morbidade, podendo ocasionar sequelas graves e doenças fatais, como acontece com cepas de maior virulência, uma carga infectante maior, uma via de penetração mais favorável e um hospedeiro com suas defesas orgânicas deficientes (DUBEY, 1987).

Existem três tipos de cepas de *T. gondii* baseadas no polimorfismo de fragmentos do DNA, gerados com enzimas de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP); estas são designadas de tipo I, II e III, que podem infectar tanto animais como seres humanos. Há outra classificação de cepas diferentes, as recombinantes (mistura dos gens das cepas dominantes) ou exóticas (com estrutura genética diversa), e causam somente 1 a 5% das infecções. As três cepas dominantes diferem em virulência e padrões epidemiológicos, assim como na estrutura proteica: as principais proteínas são comuns a todas elas, mas existem proteínas que são específicas para cada uma (WONG; REMINGTON, 1993; DARDÉ; AJZENBERG, 2003; DUBEY, 2003).

Em pacientes com doença congênita, são relatados os tipos I e II, já os isolados em animais são predominante do genótipo tipo III. As cepas de *T. gondii* tipo I são extremamente virulentas, produzindo altos níveis de parasitemia com aumento do risco de transmissão transplacentária e aumento da morbi-mortalidade em fetos em desenvolvimento. Entretanto cepas dos tipos II e III levam a doença crônica e produção dos cistos teciduais (HOWE; SIBLEY, 1995).

2.2.3 Morfologia e Ciclo de Vida

O *T. gondii* apresenta três estágios infecciosos: taquizoítos, bradizoítos (dentro de cistos teciduais) e oocistos (nas fezes de felinos). Essas três formas apresentam organelas características do filo apicomplexa, visíveis em microscopia eletrônica de transmissão (NEVES et al, 2016).

Em relação à reprodução existem duas fases distintas: assexuada (extraintestinal) e sexuada (enteroepitelial), sendo que no hospedeiro intermediário só ocorre assexuada (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os felinos são considerados hospedeiros definitivos e os demais mamíferos, aves e outros animais são considerados hospedeiros intermediários (DUBEY, 2004; NEVES et al, 2016).

O taquizoíto é a forma encontrada durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada forma proliferativa, forma livre ou trofozoíto. O nome dado ao gênero foi devido a sua forma característica de arco, vulgarmente conhecida como “*bananinha*”. Forma infectante de multiplicação rápida (*tachis* = rápido), por um processo denominado endodiogenia (forma especializada de divisão assexuada), responsável pelas possíveis manifestações clínicas. Podem ser encontradas dentro

do vacúolo citoplasmático (vacúolo parasitóforo) de várias células, como nos líquidos orgânicos, nas excreções, em células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), nas células hepáticas, pulmonares, nervosas, submucosas, e as musculares. Os taquizoítos são pouco resistentes à ação do suco gástrico no qual são destruídos em pouco tempo (KAWAZOE, 2005; PENG; CHENG; LINDSAY, 2011).

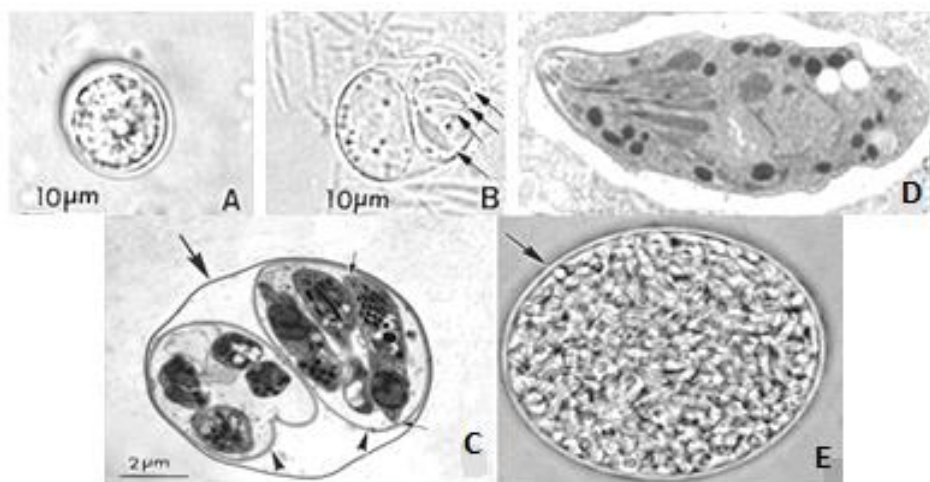
A forma infectante de resistência do protozoário nos tecidos é o cisto contendo milhares de bradizoítos (CIMERMAN; CIMERMAN, 1999). Estes cistos podem ser encontrados em tecidos: muscular esquelético, cardíaco, nervoso, retina (NEVES et al., 2016) e se inicia através da resposta imune do hospedeiro, onde há o estabelecimento de uma infecção crônica caracterizada pela conversão de taquizoítos em bradizoítos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os bradizoítos são morfologicamente semelhantes aos taquizoítos; apresentam, contudo, uma taxa de multiplicação lenta. Essa forma infectante de *T. gondii* é considerada a forma de resistência do parasito sendo encontrada no interior de cistos que são formados nos tecidos do hospedeiro. Esses cistos possuem variações no tamanho, medindo de 5 a 70µm e podem conter de centenas a milhares de bradizoítos em seu interior (DUBEY, 2004; SULLIVAN; JEFFERS, 2012); sua parede é resistente e elástica, que isola os bradizoítos da ação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro, são muito mais resistentes a tripsina e a pepsina do que os taquizoítos e podem permanecer viáveis nos tecidos por vários anos (KAWAZOE, 2005).

Os oocistos são produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes e são eliminados imaturos junto com as fezes. Em condições adequadas de umidade e temperatura o oocisto sofre esporulação formando dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. Após uma infecção aguda no gato, os oocistos são liberados em grandes quantidades pelas fezes, chegando a bilhões por dia. Essa eliminação maciça de oocistos é máxima entre cinco e dez dias após a infecção inicial e dura apenas algumas semanas. O oocisto, após sua maturação, é viável por muitos meses e até anos no solo, desde que em condições razoáveis de umidade relativa. Esta forma ao ser ingerida por hospedeiro intermediário é rapidamente liberada pelos sucos digestivos, promovendo a invasão de células e a toxoplasmose (HINRICHSSEN et al., 2005).

Todas estas formas infectantes (Figura 2) estão ligadas a um ciclo biológico complexo, heteroxeno (Figura 3), que podem causar infecção, tanto no hospedeiro intermediário como no definitivo, por meio de uma das seguintes rotas de

transmissão: horizontal, por ingestão de oocistos esporulados infectantes do ambiente; horizontal, através da ingestão de cistos teciduais contidos na carne crua ou mal cozida provenientes dos animais infectados; ou vertical, por meio da transmissão transplacentária de taquizoítos. Além disso, os taquizoítos também podem ser transmitidos pelo leite da mãe para a sua prole (DUBEY, 2004, 2010).

Figura 2 - Formas evolutivas *Toxoplasma gondii* (Micrografia Eletrônica). A= oocisto imaturo (massa central – esporonte, ocupando a maior parte do oocisto); B = oocisto esporulado com dois esporocistos (as setas indicam os quatro esporozoítos visíveis em um esporocisto), C = oocisto apresentando uma fina parede (seta grande), dois esporocistos (cabeças de setas) e esporozoítos, corte longitudinalmente (pequenas setas); D = taquizoíto da cepa VEG em uma célula de exsudato peritoneal de camundongo; E = cisto tecidual cerebral de um camundongo (seta indica parede do cisto envolvendo centenas de bradizoítos).



Fonte: DUBEY et al, 1998.

Os hospedeiros definitivos, os felídeos, se infectam principalmente pelo carnivorismo, ou seja, pela ingestão especialmente de pequenos roedores e de aves, como pardais e outros pássaros. Podem também contrair a infecção, pela ingestão de fezes de outros gatos infectados (LANGONI; SILVA; CABRAL, 2001).

Depois da ingestão de alguma das formas infectantes, ocorre no intestino dos felídeos, o ciclo enteroepitelial do parasita, ou ciclo sexual. Após a ingestão do cisto tecidual, por felídeos, a parede do cisto é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado, liberando os bradizoítos (DUBEY et al., 1998). Se a ingestão for de oocistos maduros, também no estômago são liberados os esporozoítos. A ingestão de taquizoítos também pode acontecer. Os bradizoítos,

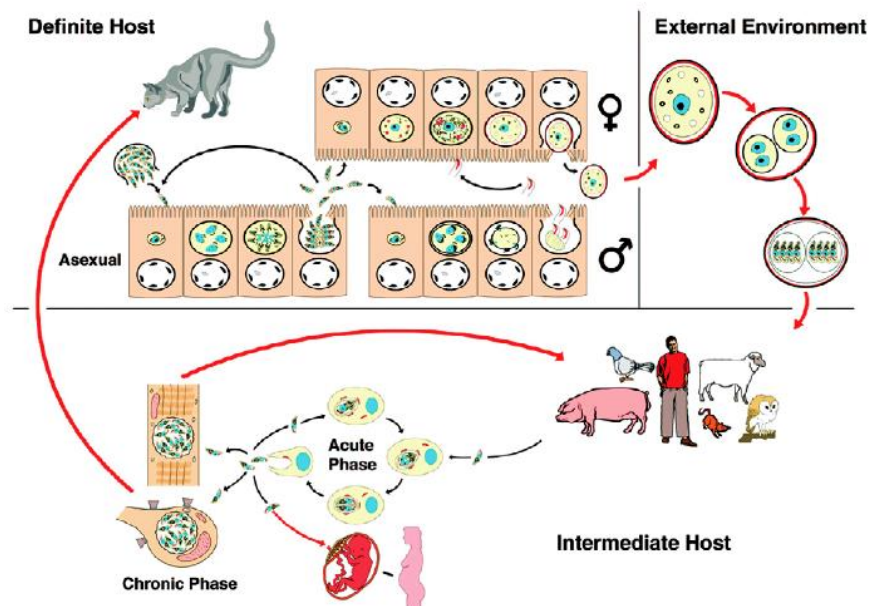
esporozoítos e taquizoítos penetram nas células intestinais dos felídeos (KAWAZOE, 2005).

Nas células epiteliais do intestino, há o início da etapa assexuada do ciclo, na qual os parasitos começam a se multiplicar pelo processo de endodiogenia (merogonia). Há então a formação de merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo, conjunto que recebe o nome de esquizonte maduro (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Os merozoítos são liberados das células e iniciam a formação dos gametas ou gametogonia (etapa sexuada). Os gametócitos femininos e masculinos encontram-se no interior das células epiteliais intestinais e a sua fusão termina na formação de oocistos, que são liberados para a luz intestinal e saem nas fezes, (LAPIIN, 1994).

Depois que o hospedeiro intermediário, ou também os felídeos, ingerirem oocistos maduros, da água ou comida contaminada, ocorre a ruptura do oocisto no intestino liberando os oito esporozoítos. Os esporozoítos irão se multiplicar nas células intestinais e nódulos linfáticos, e serão formados os taquizoítos (PIZZI, 1997), que disseminam-se pelo sistema vascular e atingem vários órgãos, como o sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético, vísceras e olhos. Nestes tecidos, os taquizoítos se multiplicam intracelularmente e, caso a multiplicação seja intensa, causam lise celular e desencadeiam reação inflamatória local. O desenvolvimento de resposta imune protetora leva ao encistamento do organismo, formando os cistos teciduais que contêm bradizoítos, os quais permanecem latentes sem causar doença (DUBEY et al., 1998).

Figura 3 - Ciclo de vida completo do *Toxoplasma gondii*.



Fonte: FERGUSON, 2009.

2.2.4 Aspectos Imunológicos

Pela característica de intracelularidade obrigatória do *T. gondii*, a resposta mais importante para a proteção dos hospedeiros à infecção é a imune celular. Entretanto, a resposta humoral, assim como a inata também são ativadas nos indivíduos com toxoplasmose (GRAZZINELLI; DENKERS; SHER, 1993; INNES; VERMEULEN, 2006).

A forma inata de resistência do agente se assemelha aos que operam nas doenças bacterianas e virais (TIZARD, 2002). A imunidade inata da toxoplasmose é composta primeiramente pela barreira física, pois durante infecções naturais por transmissão via oral, o protozoário ultrapassa o epitélio intestinal, disseminando-se aos tecidos mais profundos e ultrapassando outras demais barreiras biológicas como: placentária, cerebral e retiniana (BUZONI-GATEL; KASPER, 2007).

Macrófagos, células “natural killer” (NK), células polimorfonucleares, monócitos, complemento, lisozimas e interferon atuam na primeira linha de defesa do organismo (CAMARGO, 1995). As células dendríticas, derivadas das células da medula óssea, são as mais eficientes células apresentadoras de antígeno APC “Antigen-presenting cell”, sendo de grande importância para ativação da imunidade específica, elas são encontradas nos epitélios superficiais e uma vez captado o

antígeno, se movem em direção aos órgãos linfóides regionais para entrar em contato com células capazes de reconhecerem o antígeno que transportam (HART, 1997), porém estas podem servir como veículos para a disseminação sistêmica do parasita no início da infecção (WALWYN et al., 2015). Células NK tem função citotóxica; secretam citocinas, principalmente IFN- γ , fundamental na defesa contra o agente (BLISS et al., 1999).

Durante o início da infecção aguda, o parasita estimula de forma direta os macrófagos a produzirem interleucina (IL) -1 β , IL-12 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), estas citocinas estimulam células NK a produzirem IFN- γ que, por sua vez, esta estimula a atividade microbicida dos macrófagos. Normalmente os macrófagos são capazes de fagocitar e matar parasitas, porém, no caso de *T. gondii*, os taquizoítos podem invadir os macrófagos e multiplicar-se (DENKERS, 2003), estes não são destruídos, uma vez que podem bloquear a fusão do fagolisossomo e causar a apoptose da célula (TIZARD, 2002). Os macrófagos respondem com alguns mecanismos efetores, como a produção de radicais tóxicos do oxigênio e intermediários do nitrogênio, degradação do triptofano intracelular do parasita. Esta primeira linha de defesa atua antes do desenvolvimento da resposta imune adquirida (HUNTER et al., 1996).

A imunidade celular ao *T. gondii* é responsável pelo controle da infecção, sendo esta duradoura e eficiente (CARRUTHERS, 2002). Em resposta à estimulação antigênica, os linfócitos T auxiliares (Th), caracterizados pela presença do marcador de superfície antígenos T CD4+, liberam citocinas, no qual a função é estimular a proliferação e a diferenciação dos linfócitos, incluindo os linfócitos B, e dos macrófagos (ABBAS; LICHTMAN, 2005), sendo promotores da resposta celular e na estimulação da síntese de anticorpos, que atuam também no controle da parasitemia; já as células T CD8+ e células NK agem como efetoras citotóxicas diretas sobre as células parasitadas (CARRUTHERS, 2002), lisando e expondo extracelularmente os parasitas, contribuindo na proteção contra a formação de cistos teciduais. Ambos os linfócitos T CD4+ e T CD8+ atuam de maneira conjunta e complementar contra *T. gondii* (GAZZINELLI; DENKERS; SHER, 1993).

Linfócitos Th são divididos nas subpopulações Th1 e Th2, distinguidas pelo padrão seletivo de produção de citocinas. Durante a infecção o parasita induz rapidamente uma forte resposta de T auxiliar do tipo Th1, caracterizada pela alta ativação de células T e pela produção citocinas pró-inflamatórias incluindo fator de

necrose tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , interleucina (IL) -12 e óxido nítrico (iNOS). Entretanto, outras citocinas antiinflamatórias a IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF)- β , controlam a infecção por *T. gondii* e asseguram a sobrevivência do hospedeiro durante as fases aguda e crônica da infecção (LIESENFELD, 2002). O efeito antagônico dessas citocinas, demonstrando caráter imunossupressor inflamatório, tem ação favorável tanto para o parasita quanto para o hospedeiro: para o parasita, frente à redução da atividade microbicida dos macrófagos, primariamente induzida por (IFN)- γ , o que possibilita a multiplicação intracelular do *T. gondii*; para o hospedeiro, visto que um processo inflamatório/infeccioso excessivo poderia acarretar a morte do animal parasitado (GAZZINELLI et al., 1996).

As células de perfil Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Na infecção toxoplásmica, podem promover a multiplicação parasitária; entretanto, elas também são meios para controlar a resposta imune pró-inflamatória prejudicial (ROBERTS; McLEOD, 1999).

A resposta imune humoral inicia sob a ação das citocinas Th1 e pode persistir por anos. Os anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE, que além de serem utilizados para a realização de diagnóstico da infecção pelo protozoário também agem na primeira barreira de defesa contra o *T. gondii*, diminuindo o número dos agentes entre as células, sendo uma resposta imune que quase não possui nenhuma influência nas formas intracelulares do parasita, ou seja, não oferece proteção contra os agentes vivos dentro da célula. Os taquizoítos extracelulares cobertos pelos anticorpos e complemento podem ser lisados pela via clássica do complemento ou sofrerem a destruição dentro dos fagócitos (HUNTER et al., 1996; TIZARD, 2002).

A fase aguda da doença é caracterizada pela síntese de IgM e IgA, seguida pela síntese de IgG em de baixa avidéz e em pequenas quantidades. A elevação dos títulos de IgM é de curta duração, com a IgA desaparecendo antes dos anticorpos IgM (KAWAZOE, 2005), não proporcionando proteção, apenas serve como indicador da enfermidade. Tanto IgA como IgM são utilizadas para diagnóstico da toxoplasmose congênita, pois não conseguem atravessar a placenta (CAMARGO, 1995; KAWAZOE, 2005). IgG pode persistir com altos títulos e afinidade por um longo período, onde se dá a fase crônica (CAMARGO, 1995). Em um dos estudos da avaliação da resposta imune em caprinos infectados experimentalmente por *T. gondii* os grupos infectados apresentaram soroconversão

só a partir do 15º dia e os títulos de IgG específica continuaram crescendo nas demais avaliações, apresentando níveis séricos máximos no 60º dia, reduzindo somente no dia 120º (SANTOS, 2015). Nessa fase crônica da doença taquizoítos intracelulares e bradizoítos persistem, podendo durar por toda a vida do hospedeiro. Os cistos contendo bradizoítos parecem não estimular a resposta inflamatória, sendo não imunológicos dessa forma (CAMARGO, 1995; TIZARD, 2002), principalmente cistos viscerais e os taquizoítos presentes no cordão espinhal e cerebral, pois em órgãos neuronais a resposta imunológica não é tão efetiva (DUBEY, 1998).

2.2.5 Diagnóstico Laboratorial

Para o diagnóstico da toxoplasmose é fundamental o emprego de técnicas com elevada especificidade e sensibilidade, assim como a adoção de medidas que visem o controle dessas enfermidades em animais de produção. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas nas últimas décadas com o objetivo de facilitar um diagnóstico etiológico da infecção e a determinação da fase da infecção do indivíduo (CAMARGO, 1974).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de métodos parasitológicos (demonstração direta, busca e isolamento do coccídeo), como também por métodos imunológicos (métodos indiretos) (MACIEL; ARAÚJO 2004).

2.2.5.1 Diagnóstico Parasitológico

Classicamente o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado na pesquisa de anticorpos, porém a confirmação do parasita pela demonstração dos seus componentes, como antígenos e segmentos de DNA, é de alto valor diagnóstico, tornando possível a utilização da PCR para a sua detecção (CAMARGO, 1996; CRISTO; BRITO; FERNANDES, 2005).

A pesquisa direta do *T. gondii* pode ser feita a partir de diversas amostras orgânicas como: sangue, líquido cefaloraquidiano, saliva, escarro, medula óssea, cortes de placenta, além de conteúdos de infiltrados cutâneos, do baço, fígado, músculos e gânglios linfáticos. Uma porção do material obtido por punção ou biópsia pode ser utilizada para fazer diagnóstico por inoculação em camundongos e outra

parte pode ser fixada e submetida a exame histopatológico. A demonstração de taquizoítos e bradizoítos em biópsia de tecidos pode ser feita utilizando hematoxilina-eosina ou imunohistoquímica, ou pela técnica de imunofluorescência em tecidos (LAPPIN, 1994).

Pescador et al. (2007), analisaram pelo método de imuno-histoquímica, seis fetos caprinos abortados no Rio Grande do Sul encontrando *T. gondii* em vários tecidos de um dos fetos que possuíam lesões degenerativas. Nos outros cinco animais, foram encontrados DNA do *T. gondii* e, os seis tinham títulos 1:512 até 1:2048 na RIFI.

Através dos hospedeiros definitivos, oocistos podem ser observados no exame de fezes, porém esse método não é sensível, já que o número de oocistos presente nas fezes pode ser tão pequeno que não é detectado por métodos diretos, sendo considerada uma técnica não confiável pela maioria dos autores. O ideal, como opção, é inocular os oocistos esporulados em camundongos ou tecidos residuais, (DUBEY, 1994; HILL; DUBEY, 2002; DAGUER, 2004).

2.2.5.2 Diagnóstico Sorológico

A utilização de testes sorológicos para a demonstração de anticorpos anti - *T. gondii* é de grande importância no diagnóstico da toxoplasmose caprina e dos demais ruminantes, frente às limitações encontradas nos demais diagnósticos dificultados pela quase totalidade de formas assintomáticas (CHIARI; LIMA; LIMA, 1986; BAHIA, et al., 1993). Além disso, quando sintomática, a toxoplasmose poder assumir quadros clínicos facilmente confundidos com grande variedade de enfermidades, dificultando a tomada de medidas específicas de controle e tratamento (VIDOTTO, 1992).

Existem dois tipos principais de testes sorológicos. Os que usam organismos inteiros como antígenos e aqueles que utilizam extratos antigênicos de parasitas lisados. Os primeiros são representados pelo teste do corante de Sabin Feldman, pela imunofluorescência indireta e pelo ensaio de aglutinação por imunoabsorção de IgM, que demonstram principalmente anticorpos dirigidos contra os antígenos da membrana do parasita. Os demais que usam o extrato antigênico de parasitas lisados incluem o teste de hemaglutinação passiva e os ensaios imunoenzimáticos (DUFFY et al., 1989). Dos testes mencionados, a imunofluorescência indireta é

altamente específica, mas demonstra sensibilidade não tão elevada, além de requerer material especial e ser afetada pela subjetividade na leitura (MALIK; DREESSEN; DE LA CRUZ, 1990), enquanto o ELISA apresenta grande sensibilidade, é quantitativo, de baixo custo, amplamente utilizado para diagnóstico da infecção recente ou ativa, podendo ser automatizado (DUBEY et al., 1995).

Por meio dos ensaios imunoenzimáticos, podem ser detectados anticorpos específicos de diferentes isotipos (IgG, IgM, IgA e IgE) no soro ou em outras amostras biológicas, como saliva, leite (coloostro), líquido e líquido amniótico (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004). Casos de toxoplasmose aguda podem ser identificados usando anticorpos secundários específicos para o isotipo da cadeia pesada das diferentes classes de imunoglobulina (IgM, IgA) que indicam infecção recente (DECOSTER, 1997).

Outro marcador sorológico capaz de distinguir entre infecções agudas e infecções crônicas, diz respeito à avididade dos anticorpos IgG específicos (BAHIA et al., 1995; CONDE et al., 2001). Em infecções recentes, uma alta porcentagem destes anticorpos apresenta baixa avididade, e ao longo de semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando avididade crescente, de modo que, nas infecções de mais longa duração, encontra-se um predomínio marcante de anticorpos de grande afinidade (CARNEIRO, 2006). Sendo assim necessário a demonstração de altos e crescentes títulos de anticorpos IgG específicos em amostras pareadas de soro com intervalos de 2-4 semanas ou demonstração de anticorpos IgM específicos em uma única amostra de soro (DUBEY, 1988).

2.2.6 Controle e Tratamento

Atualmente o controle desta parasitose depende basicamente do tratamento curativo dos casos agudos e de medidas profiláticas que impeçam a disseminação de oocistos esporulados. Para diminuir a infecção nos animais de criação, principalmente nos ovinos, caprinos e suínos, o número de gatos nas criações rurais deve ser reduzido. As membranas fetais e fetos abortados devem ser removidos por pessoas usando luvas e enterradas ou incinerados, para prevenir infecção em gatos e em outros animais da criação. Deve-se fazer o controle de artrópodes (moscas e baratas), já que eles podem ser disseminadores mecânicos de oocistos (MEDEIROS, 2010; DUBEY, 1994).

Em situações domésticas, a prevenção de infecção requer a limpeza diária dos locais usados pelos animais e a remoção adequada das fezes. Devem ser observadas também precauções higiênicas, como lavar as mãos antes de comer e o uso de luvas em jardinagem, pois os canteiros de flores e de verduras são áreas de defecação prediletas dos gatos. Mulheres grávidas não devem efetuar a limpeza de gatos. Além disso, os mesmos não devem ser alimentados com carne crua. Nas fazendas, o controle é mais difícil, mas quando possível às rações dos animais devem ser cobertas para impedir o acesso de gatos, roedores e insetos (HILL; DUBEY, 2002).

Em relação ao tratamento, existe uma crescente preocupação com o desenvolvimento da resistência as drogas por animais destinados a alimentação humana. Além disso, não existe nenhuma droga disponível que possa agir contra o estágio de cisto tecidual do *T. gondii* e assim curar pessoas ou animais nesta fase da infecção. O desenvolvimento de vacinas também tem se mostrado uma estratégia promissora para o controle da toxoplasmose (MEDEIROS, 2010).

As drogas utilizadas para o tratamento da toxoplasmose em animais de produção são: pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico, podendo ser usadas em surtos de aborto. Devem ser realizadas durante três dias e por três períodos com intervalos de cinco dias. Este tratamento foi descrito como eficaz contra taquizoítos, mas não bradizoítos, sendo também bastante tóxico em gatos (HILL; DUBEY, 2002), onde a droga de eleição para eles e para os cães é a clindamicina (McCANDLISH, 2001).

3 ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Dinâmica da infecção natural por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em caprinos¹

Keziah M. Sant'Ana^{2*}, Walter F.B. Leão-Filho², Laura M.G. Silva², Camila M. Pedrosa², Müller R. Andrade³, Pomy C.P. Kim², Rinaldo A. Mota³ e Wagnner J.N. Porto²

ABSTRACT. Sant'Ana K.M., Leão-Filho W.F.B., Silva L.M.G., Pedrosa C.M., Andrade M.R., Kim P.C.P., Mota R.A. & Porto W.J.N. 2018. **[Dynamics of natural infection by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in goats.]** Dinâmica da infecção natural por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em caprinos. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias Universidade Federal de Alagoas, Fazenda São Luís, 57000-000, Viçosa, AL, Brasil. Email: keziah_ms@hotmail.com

The present study aimed to verify *N. caninum* and *T. gondii* natural infection dynamics in naturally infected goats during six months in a farm in the semi-arid of Pernambuco. In total, 287 female goats were tested serologically by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay test (ELISA), at reproductive age and through the results obtained 73 of them were part of the experimental group, which was separated as follows: G1, composed of 13 animals, infected by *T. gondii*; G2, consisting of 13 animals infected by *N. caninum*, G3 composed of 13 animals infected by *T. gondii* and *N. caninum*, G4 composed of 34 animals that were not infected (control group). The initial prevalence for both agents on the property was 35.62% (26/73) and the lack of prophylaxis and control measures increased the incidence up to 76.6% for *N. caninum* and 27,66% for *T. gondii* in the herd, after six months. The seroprevalence described in the study area indirectly demonstrates the agents circulation mainly by horizontal transmission in the goat herd.

INDEX TERMS: Neosporosis, toxoplasmosis, goats.

RESUMO. O presente estudo objetivou estudar a dinâmica da infecção natural por *N. caninum* e *T. gondii* em caprinos naturalmente infectados durante seis meses em uma fazenda no sertão de Pernambuco. No total, foram testados sorologicamente pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) 287 caprinos fêmeas, em idade reprodutiva e através dos resultados obtidos, 73 destas fizeram parte do grupo experimental que foi separado da seguinte maneira: G1, composto por 13 animais, infectados por *T. gondii*; G2, composto por 13 animais infectados por *N. caninum*, G3 composto por 13 animais infectados por *T. gondii* e *N. caninum*, G4 composto por 34 animais que não estavam infectados (grupo controle). A prevalência inicial para ambos os agentes na propriedade foi de 35,62% (26/73) e a falta de profilaxia e medidas de controle geraram, após seis meses, uma incidência de 76,6% para o *N. caninum* e 27,66% para *T. gondii* no rebanho. A soroprevalência descrita na área de estudo demonstra de forma indireta a circulação dos agentes principalmente pela via de transmissão horizontal no rebanho caprino.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Neosporose, toxoplasmose, cabras.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Alagoas, Fazenda São Luís, 57000-000, Viçosa, AL, Brasil. *Autor para correspondência: keziah_ms@hotmail.com

³ Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Bacterioses da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil.

INTRODUÇÃO

Uma das principais causas de perdas econômicas na indústria pecuária é o aborto em rebanhos de pequenos ruminantes, devido à sua alta prevalência, onde a produtividade destas criações depende em grande parte da sua eficiência reprodutiva (Moreno et al. 2012).

Existe uma grande variedade de agentes infecciosos que são reconhecidos como abortivos para caprinos e ovinos e alguns com potencial zoonótico, destacando-se bactérias como *Chlamydophila abortus*, *Coxiella burnetii*, *Brucella melitensis*, *Campylobacter* spp.; agentes virais como o herpesvírus caprino e pestivírus; protozoários como *Toxoplasma gondii* e mais recentemente, *Neospora caninum*, que vem ganhando destaque nos últimos tempos (Kirkbride 1993, Moeller-Júnior 2001, Fthenakis & Papadopoulos 2018).

A transmissão do *N. caninum* e do *T. gondii*, tanto pode ocorrer pela via horizontal (infecção pós-natal), quando o hospedeiro intermediário é infectado pela ingestão de oocistos esporulados, como pela via transplacentária, que ocorre de uma fêmea infectada para sua prole, sendo esta a mais relevante (infecção congênita) (Dubey et al. 2011). A transmissão transplacentária endógena (recrudescência de uma infecção crônica) é uma das principais rotas de infecção por neosporose, e estudos têm demonstrado altas taxas de bezerros congenitamente infectados que podem nascer saudáveis e transmitir o parasito para a próxima geração (Paré et al. 1996, Schares et al. 1998).

Para compreender os detalhes da dinâmica da infecção natural por neosporose e toxoplasmose em caprinos é necessário realizar mais estudos, a fim de determinar a manutenção da infecção no rebanho através da transmissão horizontal e vertical, bem como compreender a cinética da resposta imune humoral. O objetivo do presente estudo foi avaliar a dinâmica da infecção natural por *T. gondii* e *N. caninum* em caprinos fêmeas, naturalmente infectadas, em uma fazenda localizada no sertão de Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, pela Universidade Federal de Alagoas, sob o número de licença 78/2017.

Foram acompanhados, durante seis meses, caprinos fêmeas sem raça definida (SRD), em idade reprodutiva, criadas sob regime extensivo, provenientes de uma fazenda no município de Jatobá, Sertão de Pernambuco, Brasil. Todas as cabras no rebanho foram primeiramente testadas sorologicamente (ELISA) para detectar fêmeas naturalmente infectadas por *T. gondii* e *N. caninum* para assim formar o grupo experimental. No total, foram testados sorologicamente 287 caprinos fêmeas e através dos resultados obtidos, 73 destas fizeram parte do grupo experimental que foi separado da seguinte maneira: G1, composto por 13 animais, infectados por *T. gondii*; G2, composto por 13 animais infectados por *N. caninum*, G3 composto por 13 animais infectados por *T. gondii* e *N. caninum*, G4 composto por 34 animais que não foram infectados (grupo controle). Todos os animais dos grupos foram negativos para, *Brucella* sp. e *Chlamydophila abortus*.

Histórico da Propriedade. Foi realizada a avaliação do histórico clínico da exploração e das características do sistema de manejo com ênfase especial às taxas de aborto e falhas reprodutivas registradas nos últimos anos, o padrão de apresentação dos abortos (endêmico-epidêmico) e as causas etiológicas implicadas, assim como, a presença de fatores associados à infecção por *T. gondii* e *N. caninum* como a presença dos hospedeiros definitivos na criação. Durante o período do estudo não houve nenhuma alteração na forma de exploração dos animais.

Monitoramento Sorológico da Infecção. Para estudar a prevalência da toxoplasmose e neosporose na propriedade, todos os 73 caprinos fêmeas dos grupos G1, G2, G3 e G4 foram monitorados mensalmente durante um período de seis meses, através de colheitas de sangue mensais. Investigação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e IgG anti-*N. caninum* no soro de caprinos foi realizada por meio da técnica de ELISA indireto.

Amostra Biológica. Foi obtido o volume de 5ml de amostra de sangue em tubos de ensaio de polipropileno, sem anticoagulante de cada caprino com títulos para *T. gondii* e *N. caninum* através da venopunção da jugular externa com agulhas hipodérmicas descartáveis 40X12.

Avaliação da Transmissão Vertical. Nos animais que completaram a gestação, foram coletadas amostras de sangue de cabritos antes da ingestão de colostro para avaliar a presença de anticorpos para *T. gondii* e *N. caninum*.

Processamento do Material. As amostras de sangue obtidas foram dispostas em caixas isotérmicas contendo baterias de gelo reciclável, onde posteriormente foram levadas para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Alagoas – Unidade Educacional Viçosa (UFAL), onde foram centrifugadas a 3.000 rpm para a obtenção do soro, este por sua vez foi acondicionado em microtubos tipo eppendorf® de 1,5mL e armazenados a - 20°C até o momento da realização dos testes.

ELISA para *T. gondii* e *N. caninum*. A análise sorológica do material colhido ocorreu na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no Laboratório de Bacterioses. Os níveis de anticorpos IgG específicos contra *T. gondii* e *N. caninum* foram mensurados através da técnica de ELISA indireto, utilizando os antígenos

linfofilizados de *T. gondii* e *N. caninum* para sensibilizar as microplacas, seguindo uma versão modificada do protocolo descrito por Álvarez-García et al. (2003).

O antígeno foi utilizado na concentração de 105 taquizoitos/poço, diluídos em uma solução de bicarbonato de carbonato (0,1 M; pH 9,6), e o volume final de 100 µL em cada poço. A proteína G-biotina (SigmaAldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) foi usada como conjugado, diluído em 5% de PBS-Tween em proporções de 1: 15.000. Solução ABTS (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, EUA) foi usado como substrato. A reação foi interrompida após 20 minutos à temperatura ambiente, adicionando 0,3 M de ácido oxálico à solução. O produto foi lido por meio de um Espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, FI01620, Vantaa, Finlândia) usando um comprimento de onda de 405 nm densidade, OD = 405). Os valores de densidade óptica foram convertidos para índice relativo por cento (IRPC) por meio da fórmula: $IRPC = (Amostra\ OD405 - controle\ negativo\ OD405) / (controle\ positivo\ OD405 - Controlo\ negativo\ de\ OD405) \times 100$. O IRPC ≥ 10 foi utilizado para indicar resultado positivo.

Análises Estatísticas. A análise estatística descritiva foi realizada utilizando as frequências relativas e absolutas das variáveis.

RESULTADOS

A prevalência inicial de toxoplasmose e neosporose foi de 35,62% (26/73) e durante a observação, a incidência de toxoplasmose foi 27,66% (13/47) e de neosporose foi 76,6% (36/47).

A propriedade possuía histórico de abortos nos últimos meses, mas durante o período de acompanhamento do rebanho não foi observado nem relatado nenhum caso, porém, quatro cabras pariram filhotes clinicamente saudáveis, sendo uma de cada grupo (G1, G2, G3 e G4). No entanto, foi constatada a transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em um animal do G3 e de *Neospora caninum* em um animal do G2.

Foi possível observar que a via de transmissão para neosporose e toxoplasmose mais frequente, aos caprinos na propriedade é a via horizontal, devido à exposição destes animais a fontes de infecção persistentes, sendo um dos principais indícios, a presença de hospedeiros definitivos e mecânicos entre o rebanho, ausência de programas de controle e profilaxia de agentes infecciosos e desorganização do plantel.

DISCUSSÃO

A propriedade utilizava um regime de criação extensivo sem estação de monta. Algumas falhas de gestão neste regime foram observadas, como a ausência de local adequado para armazenamento de alimentos, a ausência de um programa de controle contra ratos, bem como a presença de cães e gatos entre o rebanho.

As raças caprinas nativas do Brasil estão localizadas no Nordeste, onde os animais são criados em sistemas extensivo e semiextensivo. São animais bem adaptados e resistentes a doenças e parasitas (Menezes et al. 2006).

Pinheiro et al. (2010) observaram, que o desenvolvimento da caprinocultura na região Nordeste tem sido afetado por inúmeros fatores, entre eles a alta incidência de doenças, influenciado pelo manejo sanitário deficiente em criatórios, promovendo alta mortalidade de animais, principalmente dos jovens.

Em estudo realizado por Alencar et al. (2010) no sertão de Pernambuco, destaca que a deficiência tanto da sanidade quanto também das tecnologias disponíveis impossibilita o controle de doenças principalmente as de origem infecciosa e parasitária que interferem na produtividade.

É importante ressaltar, que durante o estudo os hospedeiros definitivos, tanto para neosporose como para toxoplasmose tinham acesso livre por toda propriedade, não havendo controle, cães e gatos tinham contato direto com os caprinos, ao concentrado destes e todo o ambiente da criação. McAllister et al. (1998) e Dubey et al. (2007) relataram medidas de controle de modo a reduzir o risco de infecção por *N. caninum*, entre elas principalmente a de evitar o acesso de cães a tecidos infectados como fetos abortados, fluídos e restos de placentas, bem como, o acesso destes aos comedouros e bebedouros, mantendo sempre os alimentos em lugares fechados, evitando assim a contaminação; citaram também uso de maternidades individuais e medidas periódicas a fim de minimizar a presença de hospedeiros mecânicos no ambiente. Os mesmos métodos de controle são utilizados para diminuir a incidência da infecção por *T. gondii* nos animais de criação, levando em consideração o hospedeiro definitivo, os felídeos (Dubey 1994, Medeiros 2010).

O sistema de produção utilizado na propriedade em estudo é extensivo, o que possibilita menor fator de risco à infecção, pois Coberlline et al. (2006) relataram que houve uma taxa maior de infecção por *N. caninum* entre animais criados em ambiente intensivo e semiintensivo, devido à maior concentração e exposição de animais a alimentos contaminados.

Além das condições sanitárias como fator de risco e do sistema de manejo encontrado, a ausência de uma estação de monta na propriedade, que avalia a eficiência e índices reprodutivos, impossibilitou o controle da reprodutividade no plantel, onde sem esse sincronismo não conseguíamos avaliar em que período de gestação as fêmeas se encontravam, podendo ter passado despercebido algum caso de aborto durante esses seis meses de acompanhamento. De acordo com Fonseca e Souza-Fabjan (2011), estes destacam que dentre as práticas de manejo a estação de monta é uma das mais importantes, pois favorece a gestão e organização da unidade de

produção, possibilita também a concentração de partos, nascimentos e período de lactação, proporcionando a homogeneidade de lotes, como manejo nutricional e sanitário mais precisos e eficientes.

Resultados sorológicos em caprinos e ovinos para neosporose e toxoplasmose no Brasil indicam prevalência variando em torno de 9,2 a 29% (Figliuolo et al. 2004, Romanelli et al. 2007). Valores de prevalência semelhantes aos observados no presente estudo para neosporose foram relatados também no estado de Pernambuco entre 62 a 74% (Tembue et al. 2011, Azevedo-Filho et al. 2017).

Porém, um estudo que também foi realizado no Nordeste do Brasil, o resultado indicou uma baixa soroprevalência ao *N. caninum* (28,6%), entretanto o *T. gondii* apresentou-se disseminado nos rebanhos caprinos (92,8%) (Lima et al. 2008); demonstrando assim que a prevalência varia de acordo com a região estudada.

No presente estudo foi constatada a transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em um animal do G3 e de *Neospora caninum* em um animal do G2. Em cabras e em outros ruminantes, não existe a transferência pré-natal de imunoglobulina através da placenta. Consequentemente, os anticorpos específicos do parasita que são detectáveis em soros pré-colostrais provavelmente foram produzidos no pré-natal pelo feto, indicando uma resposta imune ativa contra o parasita (Staubli et al. 2006).

CONCLUSÃO

A principal via de transmissão observada na propriedade foi a horizontal, permitindo a manutenção da alta taxa de incidência. A falta de profilaxia e medidas de controle são fatores importantes para a circulação de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* no rebanho caprino.

REFERÊNCIAS

- Azevedo-filho P.C., Oliveira J.M.B., Andrade M. R., Silva J.G., Kim P.C.P., Almeida J.C., Porto J.W.N. & Mota R.A. 2017. Incidence and vertical transmission rate of *Neospora caninum* in sheep. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 52:19-22.
- Alencar S.P., Mota R.A., Coelho M.C.O.C., Nascimento S.A, Abreu S.R.O. & Castro R.S. 2010. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. Ciênc. Anim. Bras. 11(1):131-140.
- Álvarez-García G., Collantes-Fernández E., Costas E., Rebordosa X. & Ortega-Mora L.M. 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. Vet. Res. 34:341-352.
- Coberlline L.G., Smith D.R., Pescador C.A, Schmitz M., Correa A., Steffen D.J. & Driemerier D. 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms southern Brazil. Prev. Vet. Med. 74:130-140.
- Dubey J.P. 1994. Zoonosis: Toxoplasmosis. J. Americ. Vet. Med. Assoc. 205:1593-1598.
- Dubey J.P., Jenkins M.C., Rajendran C., Miska K., Ferreira L.R., Martins J., Kwok O.C. & Choudhary S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. Vet. Parasitol. 181(2-4):382-7.
- Dubey J.P., Schares G. & Ortega-Mora L.M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin. Microb. Rev. 20(2):323.
- Figliuolo L.P.C., Rodrigyres A.A.R., Viana R.B., Aguiar D.M., Kasai N. & Gennari S.M. 2004. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. Small Rumin. Res. 55:29-32.
- Fonseca J. & Souza-Fabjan J. 2011. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos. In: Conference 5th International Symposium on Goat and Sheep Production - 5th SINCORTE, João Pessoa, 2011.
- Fthenakis G.C. & Papadopoulos E. 2018. Impact of parasitism in goat production. Small. Rumin. Res. 163:21-23.
- Kirkbride C.A. 1993. Diagnoses in 1784 ovine abortions and stillbirths. J. Vet. Diagn. Invest. 5:398-402.
- Lima J.T.R., Ahid S.M.M., Barrêto Júnior R.A, Pena H.F.J., Dias R.A. & Gennari S.M. 2008. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. 2008. Brazilian J. Vet. Res. Anim. Scienc. 45(2):81-86.
- Mcallister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A. & Mcguire A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 28:1473-1478.
- Medeiros A.D. 2010. Ocorrência da infecção por *toxoplasma gondii* e avaliação da imunização em caprinos do sertão do cabugi, Rio Grande do Norte. . Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal: UFRN. 94p.
- Menezes M.P.C., Martinez A.M., Ribeiro M.N., Pimenta Filho E.C. & Bermejo J.V.D. 2006. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. Revta. Bras. Zootec. 35(4):1336-1341.
- Moeller-Júnior R.B. 2001. Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991-1998). J. Vet. Diagn. Invest. 13:265-270.

- Moreno B., Collantes-Fernández E., Villa A., Navarro A., Regidor-Cerrillo J. & Ortega-Mora L.M. 2012 Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* 187: 312-318.
- Paré J., Thurmond M.C. & Hietala S.K. 1996 Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60(2):133-139.
- Pinheiro, R.R., Gouveia, A.M.G., Alves, F.S.F. & Haddad, J.P.A. 2000. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 52(5): 534-543.
- Romanelli P.R., Freire R.L., Vidotto O., Marana E.R., Ogawa L., De Paula V.S., Garcia J.L. & Navarro I.T. 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Res. Vet. Scien.* 82(2):202-207.
- 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. *Vet. Parasit.* 80: 87- 98.
- Staubli D., Sager H., Haerdi C., Haessig M. & Gottstein B. 2006. Precolostral serology in calves born from *Neospora*-seropositive mothers. *Parasitol. Res.* 99: 398-404.
- Tembue A. A. S. M., Ramos R.A.N., Sousa T.R., Albuquerque A.R., Costa A.J., Meunier I.M.J., Faustino M.A.G. & Alves L.C. 2011. Serological survey of *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(3):246-248.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do estudo contribuíram para melhor elucidar a infecção natural tanto da neosporose quanto da toxoplasmose na espécie caprina. A soroprevalência e a alta incidência da infecção por *N. caninum* e *T. gondii*, descrita na área da pesquisa assemelha-se com os resultados obtidos em distintas propriedades ao redor do mundo e em outras regiões do Brasil, evidenciando a circulação dos agentes no rebanho caprino, sendo constatada como principal forma de transmissão a via horizontal, o que enfatiza a necessidade de implantações de medidas de controle e profilaxia nas criações, de modo a reduzir o risco destas infecções. A falta de medidas adequadas de manejo na produção de caprinos, além da ausência de práticas sanitárias básicas, como a de evitar a livre circulação de hospedeiros definitivos no rebanho, principal fator de risco observado no estudo, podem ser adotadas, pois permitem maior controle da sanidade e produtividade do rebanho

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5.ed. Philadelphia: Elsevier, 2005, p. 526.
- AGUADO-MARTÍNEZ, A. et al. N-terminal fusion of a toll-like receptor 2- ligand to a *Neospora caninum* chimeric antigen efficiently modifies the properties of the specific immune response. **Parasitology**, v. 143, p. 606-16, 2016.
- ALENCAR, S. P. et al. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 131-140, 2010.
- AMMANN, P. et al. The role of B- and T-cell immunity in toltrazuril-treated C57BL/6 WT, IMT and nude mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 93, n. 3, p. 178–187, 2004.
- ANDERSON, M. L. et al. A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, p. 241-244, 1991.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 417-431, 2000.
- ANDRADE, G. S. **Soroprevalência e fatores associados à infecção por *Neospora caninum* em ovinos e caprinos no estado de Minas Gerais, Brasil**. 2011. 69f. Dissertação (mestrado). UFLA, Lavras, 2011.
- ANDREOTTI, R. et al. Sorologia anti-*Neospora caninum* em gado de corte e em cães no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002.
- ANTONELLO, A. M. et al. Dinâmica sorológica de anticorpos contra *Neospora caninum* durante a gestação de vacas naturalmente infectadas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 553-559, 2015.
- ARRANZ-SOLÍS, D. et al. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. **Veterinary Research**, Paris, v. 47, n. 2, p. 1–13, jan. 2016.

BAHIA, M. T. et al. Diagnosis of caprine toxoplasmosis by a dot enzyme-linked immunosorbent assay. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, p.173- 182, 1993.

BAHIA, M.T. et al. Avidéz de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma* da classe IgG e sua utilização na diferenciação entre toxoplasmose recente e crônica em caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.32, p.11-16,1995.

BARR, B. C. et al. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 39-46, 1991.

BARR, B. C. et al. *Neospora*-like protozoa1 infections associated with abortion in goats. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 365-367, 23 set. 1992.

BASZLER, T. V. et al. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.4059-4064, 1999.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd**, Oslo, v. 70, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C. et al. A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite Immunology**, v. 16 ,p. 643-648, 1994.

BJÖRKMAN, C; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1497-1507, 1999.

BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BLISS S. K. et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. **Journal of Immunology**, v. 162: p. 7369-7375, 1999.

BOGER L.A.; A. L. HATTEL. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.113, p. 1-6, 2003.

BUZONI-GATEL, D.; KASPER, L. H. Innate Immunity in *Toxoplasma gondii* Infection. In: WEISS, L. M.; KIM, K. ***Toxoplasma gondii***. Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 593-607.

BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 448-452, 2006.

BUXTON, D. et al. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 1, p. 1-16, 1997.

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

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, p.143-171, 1974.

CAMARGO, M. E. Alguns aspectos atuais de diagnóstico de laboratório da toxoplasmose. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v. 155, n. 4, p. 236-239, 1995.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A. W.; DE AVILO, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 165-174.

CANADA, N. et al. Determination of an optimized cut-off value for the *Neospora* agglutination test for serodiagnosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p.225 – 231, 2004.

CANTÓN, G. J. et al. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. **Veterinary Research**, Paris, v. 45, n. 1, p. 11, 2014.

CARNEIRO, A. C. A. V. **Soro-epidemiologia da Toxoplasmose Caprina e Ovina no Estado de Minas Gerais**. 2006. 134f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropical**, Netherlands, v. 81, n. 2, p. 111–122, feb., 2002.

CHIARI, C.A.; LIMA, J.D.; LIMA, W. dos S. Anticorpos Circulantes em Caprinos Naturalmente Infectados pelo *Toxoplasma gondii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.38, p.889-898, 1986.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. 375p.

COLLANTES-FERNANDÉZ, E. et al. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2491-2494, 2006.

CONDE, M. et al. Análisis of IgG response to experimental infection with RH *Toxoplasma gondii* in goats. Comparative Immunology. **Microbiology e Infectious Diseases**, v.24, p.197-206, 2001.

CORBELLINI, L. G.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **Journal of veterinary diagnostic investigation** v.13, p. 416-419, 2001.

CRISTO, A. K; BRITTO, C; FERNANDES, O.; Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 229-235, 2005.

CUNHA, C. G. A. **Investigação de anticorpos para *Neospora caninum* em humanos e sua relação com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana**. 2013. 44 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

DAGUER, H. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p.1133-1137, jul-ago. 2004.

DARDÉ, M.L., AJZENBERG, D. Le polymorphisme du toxoplasme et ses conséquences cliniques. **Archives de Pédiatrie**, v.10, p. 45-46, 2003

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

DE SOUZA, W.; SOUTO-PADRON, T. Ultrastructural localization of basic proteins on the conoid, rhoptries and micronemes of *Toxoplasma gondii*. **Z. Parasitenkd**, v. 56, p. 123- 129, 1978.

DECOSTER, A. Detection of IgA anti-P30 (SAG 1) antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 219, p. 199-207, 1997.

DENKERS, E.Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.39, p. 93-203, 2003.

DIJKSTRA, T. et al. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 110, n. 3-4, p. 161-169, 2003.

DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology**, v. 4, p. 216-238, 2015.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in goats. **Agri-practice**, v.8, n. 3, p. 43-52, 1987.

DUBEY, J. P. Zoonosis: Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 1986 revised 1994. Disponível em: <http://www.avma.org/beta/reference/zoonosis/zntoxopl.asp>. Acesso em: 13/06/2018.

DUBEY, J. P. ***Toxoplasmosis, sarcocystis, isosporosis and cyclosporiasis***. In: PALMER, R.S.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D.I.H. Zoonosis. Oxford. Medical Publication. 1998, p. 948.

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

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology** v. 89, p. 851-853, 2003.

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

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis-a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.126, n. 1, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 55, n. 6, p. 467 - 475, dec. 2008.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep: the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v.163, n.1-2, p.1-14, 2009.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2. ed. Maryland: CRC Press, 2010. 313p.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum* Induced Abortion in Sheep. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2, p.230-3,1990.

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

DUBEY J. P.; LINDSAY D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Veterinary Clinic North American Food Animal Practice**, v. 22, n.3, p. 645- 671, 2006.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals - The last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.90-108, 2011.

DUBEY, J. P.; ACLAND, H. M.; HAMIR, A. N. *Neospora caninum* (apicomplexa) in a stillborn goat. **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 3, p. 532– 534, Jun. 1992.

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

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 192, n. 9, p.1269-85. 1 mai. 1988.

DUBEY, J. P. et al. Sensitivity and specificity of various serological tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 1030-1036, 1995.

DUBEY, J. P. et al. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p.1293-1304, 1998.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Boston, v. 192, n. 9, p.1269-85, mai. 1998.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929–946, 10 Mai. 2002.

DUBEY, J. P. et al. **Neosporosis in Animals**. 1. ed. Flórida: CRC press, 2017. Disponível em: < <https://goo.gl/qCkErM> > Acesso em 02/01/2018.

DUBREMETZ, J.F. et al. Apical organelles and host cell invasion by Apicomplexa. **International Journal Parasitology**, v.28, p. 1007-1013, 1998.

DUFFY, K. et al. Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting *Toxoplasma* specific IgM. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, n. 9, p. 1291-1295, 1989.

ELENI, C. et al. Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat fetus. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 271 - 274, 2004.

EMBRAPA. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. 1 ed. Campo Grande: Zampieri. 2003, p.25.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host–pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 126, n. 2-3, p. 79–94, feb./ apr. 2002.

EPERON, S. et al. Susceptibility of Bcell deficient C57BL/6 (MT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 5, p. 225-236, 1999.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 133-148, mar. 2009 .

FREYRE, A. **Toxoplasmosis en las especies domesticas y como zoonosis**. Montevideo: Departamento de Publicaciones de la Universidad de la Republica do Uruguay. 1989, 332p.

GARCIA-ISPIERTO I. et al. *Neospora caninum* and *coxiella burnetii* seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 74, n. 2, p. 212-220, 2010.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y.; SHER, A. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. **Infectious agents and disease**. v. 2, p. 139-149, 1993.

GAZZINELLI, R. T. et al. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 219, p.127-39, 1996.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; GAO, L. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.

GONDIM L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 159–161, Jan. 2004.

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n.1-2, p. 33-9, 2005.

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

GUIMARÃES, F. N. Toxoplasmose humana Meningoencefalomielite toxoplasmica: Ocorrência em adulto e em recém-nascido. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 38, v. 3, p.257-320, 1943.

HART, D.N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **Blood**. v. 90, p. 3245-3287, 1997.

HECKER, Y. P. et al. Cell mediated immune responses in the placenta following challenge of vaccinated pregnant heifers with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 214, p. 247-54, 2015.

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

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A European perspective of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 877-924, 2000.

HEMPHILL, A. et al. Proteins mediating the *Neospora caninum* - host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in Bioscience, Searington**, v. 5, p. 23-36, jan. 2013.

HIASA, J. et al. ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation. **Veterinary Parasitology**., v. 187, n. 3-4, p. 379-385, 2012.

HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, oct. 1999.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmissions, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.8, p.634-640, 2002.

HINRICHSEN, S. L. et al. Toxoplasmose. In: HINRICHSEN SL, ed. **Doenças Infeciosas e Parasitárias**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 421-427.

HORNOK, S. et al. Canine neosporosis in Hungary: screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 197-201, mai. 2006.

HOWE, D. K., SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Veterinary Parasitology**, v.172, n.6, p.1561-1566, 1995.

HUNTER, C. et al. Cells and cytokines in resistance to *Toxoplasma gondii*. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 219, p. 113-125, 1996.

HUNTER, C. A.; REINER, S. L. Cytokines and T cells in host defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 4, p. 413-418, 2000.

INNES, E. A. et al. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 916, p. 93-101, 2000.

INNES, E. A. et. al. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p 1523 – 1524, 2001.

INNES, E. A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 497–504, nov. 2002.

INNES, E. A. et al. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.108, n. 1-2 p.29-36, 2005.

INNES, E.A., VERMEULEN, A.N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. **Journal for Parasitology**, v. 133, p.145-168, 2006.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**.11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005.

LANGONI, H.; SILVA, A. V.; CABRAL, K. G. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. **The Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 243-244, 2001.

LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis felina. **Waltham focus**, v. 4, p. 2-8, 1994.

LIESENFELD, O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 96-101, 2002.

LINDSAY, D. S. et al. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmygoats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 9, p. 1176-1180, set. 1995.

LINDSAY, D. S. et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 657-659, 1996.

LINDSAY, D.S., BUTLER, J.M.; BLAGBURN, B.L. Efficacy of decoquinate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. **Veterinary Parasitology**, n.68, p.35-40, 1997.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no Estado do Paraná, Brasil**.2002. 184f. Tese de Doutorado em Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MACEDO, O.M., Toxoplasmose. In: CASTRO, L. P.; CUNHA, A. S.; REZENDE, J. M. **Protozooses Humanas**. São Paulo: BYK., 1994. p. 153 -169.

MACEDO JÚNIOR, A. G. Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* com potencial para produção de insumos em diagnóstico, profilaxia e proteção na neosporose. Uberlândia: UFU, 2013.

MACALDOWIE, C. et al. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 131, n. 2-3, p. 142–156, oct. 2004.

MACIEL, K. P.; ARAUJO, F. A. P. Inquérito Sorológico para Detecção de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em Caprinos (*Capra* 42º Congresso Bras. de Medicina Veterinária e 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA - 31/10 a 02/11 de 2015 - Curitiba - PR 0296 *hircus*) Criados nos Municípios de Gravataí e Viamão, Região de Grade Porto Alegre Rio Grande do Sul Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.3, n.2, p. 121-125, 2004.

MALEY, S.W. et al. Characterization of the Immune Response in the Placenta of Cattle Experimentally Infected with *Neospora caninum* in Early Gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, n. 2, p. 130–141, 2006.

MALIK, M.A.; DREESEN, D.W.; DE LA CRUZ, A. Toxoplasmosis in sheep in north eastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 263–265, 1990.

MARCAIS, A. et al. Regulation of Mouse NK Cell Development and Function by Cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 450, 2013.

MARSH, A. E. et al. Description of a New *Neospora* Species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 983-991, out. 1998.

MARTINS, E. C. et al. **Panorama e perspectiva nacional da Ovinocaprinocultura e caprinocultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2014. 4p.

MATTOS, B. C. ***Neospora caninum* em canídeos selvagens**. 2009. 70f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MCALLISTER, M. M. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 647–655, 1996.

MCALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 1473-1479, 1 set. 1998.

MCALLISTER, M.M. et al. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.881-887, 2000.

McCANDLISH, I. A. P. In: Infecções específicas caninas. DUNN, J. K.ed. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001, p. 946-947.

MEDEIROS, A. D. **Ocorrência da infecção por *toxoplasma gondii* e avaliação da imunização em caprinos do sertão do cabugi, Rio Grande do Norte**. 2010. 109f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio Grande do Norte, Natal: UFRN, 2010.

MENDONÇA, C. E. et al. Prevalence and risk factors associated to ovine toxoplasmosis in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 230-234, 2013.

MENEZES, M. P. C. et al. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Paraíba, v.35, n.4, p.1336-1341, 2006.

MEIRELLES, A. C. F. **Ocorrência e fatores de risco associados à neosporose e toxoplasmose em população humana e bovina suscetíveis**. 2014. 105f. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 11, p. 552-580, 2010.

MESQUITA, L. P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 196, n. 3-4, p. 327–333, set. 2013.

METSIS, A.; PETTSERSEN, E. *Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 Kda with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 472-479, 1995.

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

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MORENO, B. et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary parasitology**, Madrid, v. 187, n. 2012, p. 312– 318, jan. 2012.

NASCIMENTO, C. O. M. et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* DNA in brain tissue from hoary foxes (*Pseudalopex vetulus*) in Brazil. **Acta Tropica**, v. 146, p. 60–65, 2015.

NAVARRO, I. T. **Toxoplasmose**. Porto Alegre: X Congresso da ABRAVES. Palestra proferida em 18 out 2001. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/abravessc/pdf/Palestras2001/Itamar_Navarro.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2018.

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**, 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

OLIVEIRA, F. C. R.; COSTA, A. J.; SABATINI, G. A. Clínica e hematologia de Bos indicus, Bos taurus e Bubalus bubalis inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Ciência Rural**, v. 31, p. 621-626, 2001.

ORLANDO, D.R. **Eventos patológicos em placenta e soro de cabras naturalmente infectadas por *Neospora caninum***. 2017. 105f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

PENG, H.J.; CHEN, X.G.; LINDSAY, D.S.; A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **Journal Parasitology**, United States, v. 97, n. 4, p. 620-628, aug. 2011.

PESCADOR, C.A. et al. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n. 4, p. 167-171, 2007.

PARE, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p. 352-9, 1995.

PETERS, M. et al. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dog and cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.31, n.10, p.1144-1148, 2001.

PINHEIRO, R. R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo horizonte, v. 52, n. 5, p. 534-543, out. 2000.

PIZZI, H. L. **Toxoplasmosis**. 1. ed., Argentina: Rhône Poulenc Rorer Argentina, 1997, 91p.

PORTO, W. J. N. et al. Experimental 480 caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. **Veterinary Research**, v.47, n.29, 2016.

QUINN, H.E.; ELLIS, J.T.; SMITH, N.C., *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, v. 18, n.8, p. 391 – 394, 2002.

REICHEL, M.P.; PFEIFFER, D.U. An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 197 - 207, 2002.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora caninum* - How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 11, p. 1173-1187, 2009.

REMINGTON, J.S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 3, p. 941 - 945, 2004.

ROBERT- GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.

ROBERTS, F.; MCLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitology Today**, v. 15, n. 25, p. 1-7, 1999.

ROMERO, J.J.; PEREZ, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v 123, p.149-159, 2004.

ROSBOTTOM, A. et al. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 219- 228, apr. 2007.

ROSBOTTOM, A. et al. Up Regulation of the Maternal Immune Response in the Placenta of Cattle Naturally Infected with *Neospora caninum*. **PLOs ONE**, v. 6, n. 1, p. 15799-15808, 2011.

SAMPAIO, B. et al. A Economia da Caprinocultura em Pernambuco: Problemas e Perspectivas . **Revista de Economia**, v. 35, n. 2, p. 137-159, mai/ago. 2009.

SANTOS, F. S. **Avaliação da resposta imune em caprinos infectados experimentalmente por *Toxoplasma gondii***. 2015. 91f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

SCHNELL, M. **Toxoplasmose felina** - Revisão de literatura e soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em felinos domésticos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. 2011. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SENGER PL. Placentation, the endocrinology of gestation and parturition. In: Senger PL, editor. **Pathways tpregnancy and parturition**. 2. ed. Pulman, WA: Current Conception Inc; p. 304-25, 2005.

SIBLEY, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence factors. **Veterinary Microbiology**, London, v. 10, n. 11, p. 766-778, nov., 2012.

SILVA, C. H. S. **Estudo da transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas deslanadas**. 2005. 55f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

SILVA, A. F.; BRANDÃO, F. Z.; FERREIRA, A. M. R. Histórico da Neosporose na Caprinocultura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 73-78, jan. 2013.

SILVA, R. C.; MACHADO, G. P. Canine neosporosis: perspectives on pathogenesis and management. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 7, p. 59–70, set. 2016

SPEER, C. A. et al. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1509-1519, 1999.

STAUBLI, D. et al. Precolostral serology in calves born from *Neospora*-seropositive mothers. **The journal Parasitology Research**, v. 99, p. 398-404, 2006.

SULLIVAN, W.J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiology Reviews Oxford**, v. 36, n. 3, p. 717-733, oct., 2012.

TAKASHIMA, Y., et al. Prevalence and Dynamics of Antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 Antigens of *Neospora caninum* in Cattle during the Gestation Period. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 11, p. 1413-1418, 2013.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002.

UNDERWOOD, W.J.; ROOK, J.S. Toxoplasmosis infection in sheep. **The Compendium on Continued Education in Veterinary Practice**, NewYork, v.14, n. 8, p.15431549, 1992.

VARDELEON, D. et al. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, n.2-4, p.273-282, 2001.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na Saúde, **Animal Semina**. v. 13, n. 1, p. 69 – 75, 1992.

WALWYN, O., et al. Forward genetics screens using macrophages to identify *Toxoplasma gondii* genes important for resistance to IFN- γ -dependent cell autonomous immunity. **Journal of Visualized Experiments**, v.12, n.97, 2015.

WANHA, K. et al. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 3-4, p. 189 – 193, mar., 2005.

WAPENAAR, W. et al. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 166-173, 2007.

WILLIAMS, D.J. et al. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. **Veterinary Record**, v. 140, p. 28-331, 1997.

WILLIAMS, D.J.L.; WOUDA, W. An European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.30, p.877-924, 2000.

WONG, S.Y., REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **Clinical Infectious Diseases**, v.7, p. 299-316, 1993.

WOUDA, W. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, out. 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de Submissão.

Pesquisa Veterinária Brasileira



Dinâmica da infecção natural por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em caprinos

Journal:	<i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Sant'Ana, Keziah; Universidade Federal de Alagoas, Medicina Veterinária Porto, Wagner; UFAL Ribeiro-Andrade, Müller; UFRPE, Medicina Veterinária Mota, Rinaldo; UFRPE, Medicina Veterinária
Area:	Livestock Diseases
Keyword:	Neosporosis, toxoplasmosis, goats

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO B – Normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

1. Os artigos devem ser organizados em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (de preferência os últimos três separadamente), Agradecimentos, Declaração de conflito de interesse e REFERÊNCIAS:

a) O TÍTULO deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) com numerosos primeiros nomes e sobrenomes, deve(m) padronizar o seu “nome para publicações científicas”,** como por exemplo: Cláudio Severo Lombardo de Barros, escreve Cláudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F. **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores.** O autor para correspondência deve ser um autor que garanta o contato com o Conselho Editorial da PVB. Asteriscos de chamadas para o rodapé devem ser mais uma vez elevados (sobrescritos), para aparecerem maiores e mais nítidos.

c) O **Cabeçalho do ABSTRACT** deve conter, além dos nomes dos autores abreviados invertidos, o ano, o TÍTULO, o endereço postal do laboratório (inclusive o CEP) ou instituição principal onde foi desenvolvida a pesquisa. Endereços postais brasileiros não devem ser traduzidos para o inglês, mesmo em artigos escritos na língua inglesa, a fim de evitar dificuldade na postagem. Devem-se conferir os nomes dos autores do artigo e do Cabeçalho do Abstract para evitar discrepâncias.

d) O **Rodapé da primeira página** deve conter os endereços profissionais postais completos dos autores (evitando-se traços horizontais), na língua do país do respectivo autor (em português, espanhol, inglês) e seus e-mails; o e-mail do autor para correspondência deve ser sublinhado. Os sinais de chamada para os nomes dos autores devem ser números arábicos, colocados em sobrescrito, sem o uso automático de “Inserir nota de fim”, do Word (essas chamadas devem ser contínuas por todo artigo, isto é, em todas as notas de rodapé das outras páginas).

e) O **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO, mas pode ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que devem incluir termos do título, por não se tratar somente de “ADDITIONAL INDEX TERMS”.

f) O **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem termos do título, por não se tratar somente de “TERMOS DE INDEXAÇÃO ADICIONAIS”.

g) A **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal e deve finalizar com a indicação do objetivo do artigo.

h) **MATERIAL E MÉTODOS** deve reunir a totalidade dos dados que permitam o desenvolvimento de trabalho semelhante por outros pesquisadores.

i) Em **RESULTADOS** devem ser apresentados concisamente os dados obtidos.

j) Na **DISCUSSÃO** devem ser confrontados os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los.

k) **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados obtidos e devem ser apresentados em diferentes parágrafos (uma Conclusão somente deve ser apresentada em parágrafo único).

l) Os **Agradecimentos** não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; devem ser sucintos e colocados antes da Declaração de conflito de interesse e da Lista de Referências.

m) A **Declaração de conflito de interesse** é obrigatória e deve ser mencionada nos casos positivos ou negativos; deve ser sucinta e colocada imediatamente antes da Lista de Referências.

n) A Lista de **REFERÊNCIAS** deve incluir todas as citações apresentadas no texto e que tenham servido como fonte para consulta. A Lista deve ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores (em caixa alta e baixa), do ano, do título da publicação citada, e abreviado (por extenso em casos de dúvida) o nome do periódico. Sugerimos consultar exemplos dos últimos fascículos (www.pvb.com.br).

(Notem: (1) As Referências citadas no texto devem ser colocadas em ordem cronológica, mas alfabética tratando-se de referências do mesmo ano; (2) Quando utilizados programas de formatação (p.ex. Endnote X7), remover o fundo automático cinzento antes da submissão, para não dificultar eventuais correções.

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) Fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples; página formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), texto corrido em uma coluna justificada, com as Legendas das Figuras no final (logo após a Lista de REFERÊNCIAS) sem repetir as legendas junto com as Figuras.

b) ABSTRACT e RESUMO serão escritos em um só parágrafo corrente e não devem conter citações bibliográficas.

c) A redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal.

d) Os nomes científicos usados no manuscrito devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravii*), no início de cada capítulo (TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, etc.), quando aparecem pela primeira vez, seguido da abreviação do gênero (p.ex. *P. marcgravii*).

e) Nos títulos dos Quadros e nas Legendas das Figuras os nomes científicos devem ser apresentados por extenso, já que estes são independentes do texto.

f) No texto, os sinais de chamada para notas de rodapé devem ser números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word.

Notem: para evitar a separação em duas linhas, os numerais devem ser apresentados junto com suas unidades, ou seja, sem espaçamento, por exemplo: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, (P<0,05), 15h; de conveniência quando seguida de letra alta (35 kg ou 35kg, 4 h ou 4h). A abreviação de número é “no” e não “nº”; grau Celsius é “°C” e não “ºC”.

g) Os Quadros (não usar o termo Tabela) e as Figuras devem ser citados no texto, pelos respectivos números, em ordem crescente e devem ser submetidos separadamente do texto!

h) Siglas e abreviações das instituições, ao aparecerem pela primeira vez, deverão ser colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

i) Citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”, p.ex. (Caldas 2005); artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois (Pedroso & Pimentel 2013); e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano (Brito et al. 2015); se dois artigos não se distinguirem, a diferenciação será feita através do acréscimo de letra minúscula ao ano (Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação deve ser cronológica (Barbosa et al. 2003, Armien et al. 2004).

j) **Recomenda-se consultar na íntegra todos os artigos citados**; se isto não for possível, deve-se colocar no texto a referência original (não consultada na íntegra) seguida do ano, p.ex. (Bancroft 1921); na Lista de Referências deve ser incluída a referência original como: Bancroft 1921. título. ... periódico. (Apud Suvarna & Layton 2013). A referência consultada também deve ser incluída na Lista de Referências.

k) O uso de “comunicação pessoal” e de “dados não publicados” deve ser feito apenas em casos excepcionais; no texto com citação de Nome e Ano, e na Lista de Referências como: Barbosa 2016. Comunicação pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal).

l) As **Legendas das Figuras** devem conter informações suficientes para sua compreensão (independente do texto); e devem ser precedidas de “Fig.” seguida do número sem espaço, p.ex. “Fig.8. ...”. Para elaboração das legendas sugerimos consultar exemplos nos últimos fascículos (www.pvb.com.br).

(Notem: Na legenda de Figuras compostas deve-se colocar a letra de cada “subfigura” em **negrito** com parênteses claros antes do texto correspondente e devem ser mencionados letras ou sinais, que estão dentro de cada “subfigura”, em parênteses e claros após o respectivo texto da legenda.)

m) O Título dos **Quadros** devem ser em **negrito**, sem ponto, e a “garganta” (título das colunas) deve ser escrita em claro e separada por dois traços longos horizontais; o Título dos Quadros e da

“garganta” devem ser escritas em caixa alta e baixa. Os Quadros (não usem o termo Tabela) devem conter os resultados mais relevantes. Não há traços verticais, nem fundos cinzentos; excepcionalmente pode conter traços horizontais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, com “a” em cada Quadro. As chamadas de rodapé deverão ser lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda; e devem evitar números arábicos. Os títulos não têm ponto no final, ao passo que as legendas terminam com um ponto. Os Quadros devem ser apresentados em Word e ser editáveis, a fim de inserirmos eventuais alterações de apresentação, dentro das normas da revista.

n) Dados complexos devem ser expressos por Gráficos (devem ser chamados de **Figuras**). Os gráficos devem ser produzidos em 2D, sem fundo e sem linhas horizontais.

3. Apresentação das Figuras:

a) As imagens devem ser salvas em 300 dpi, arquivo TIF.

b) Numerar cada figura separadamente (1, 2, ...).

c) Figuras com assuntos similares (subfiguras) devem ser agrupadas em pranchas com espaço entre elas de aprox. 1mm. Identifique cada imagem com uma letra maiúscula (A, B, ...) colocada no canto inferior esquerdo, de preferência fonte Arial 14, branca, em um quadro preto sem bordas.

d) Usar, de preferência, barras de escala para indicar o aumento; para micrografias ópticas apresentar na legenda sempre o método de coloração e a objetiva, p. ex.: HE, obj.40x.

e) As legendas de Figuras devem conter inicialmente o que se observa na imagem, seguida das informações adicionais (Formato típico da legenda = Fig.1. Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Método de coloração e objetiva.).

4. Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências e vice-versa; na revisão final do artigo pelos autores, antes da submissão, isto deve ser conferido criteriosamente, para evitar discrepâncias (o sistema ScholarOne bloqueia automaticamente artigos com discrepâncias).

Exemplos de Referências

➤ Artigos publicados em periódicos:

Pavarini S.P., Soares M.P., Bandarra P.M., Gomes D.C., Bandinelli M.B., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2011. Mortes súbitas causadas por *Amorimia exotropa* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 31(4):291-296.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. Environ. Health 17:15-24.

(Notem: Os iniciais dos autores devem ser colocados sem espaço. O sinal “&” é usado para separar o penúltimo do último autor. As primeiras letras das palavras do título de artigos publicados em periódicos científicos devem ser de preferência minúsculas. A palavra “Revista” deve ser abreviada como “Revta” em diferença a “Rev.”, do inglês “Review”. Deve-se indicar o número do respectivo volume do periódico e, se possível, também do fascículo. Somente abreviações tem um ponto, exceto as que terminam com a última letra da palavra em extenso. O traço entre as páginas é curto (-) e não comprido. Não devem ser usados “ponto-vírgulas” (;) em lugar de vírgulas.

➤ Livros:

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.

Marsh P. & Martin M. 1992. Oral Microbiology. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.

(Notem: A primeira letra de termos do título de livros deve ser maiúscula. Devem ser mencionadas as páginas que foram consultadas, em vez do total de páginas do livro.

➤ Capítulos de livros:

Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

(Notem: As primeiras letras das palavras do título de capítulos de livros são minúsculas, mas as de livros são maiúsculas).

➤ Dissertações e Teses:

Silva R.M.M. 2016. Prevalência, identificação e distribuição das lesões abscedativas em caprinos e ovinos abatidos em um matadouro frigorífico no Estado da Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 56p.

Sant'Ana V.A.C. 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. Tese de Doutorado, Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 161p.

(Notem: (1) Deve-se evitar se referir a Dissertações ou Teses em vez de aos artigos baseados nas mesmas e publicados em periódicos científicos que são de mais fácil acesso. (2) Não deve-se tentar de publicar o texto de Dissertação ou Tese praticamente na íntegra sem escrever um artigo conciso de seus resultados.

➤ Resumos publicados em eventos:

Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). Pesq. Vet. Bras. 36(Supl.2):50-51. (Resumo).

Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.145-146. (Resumo)

