

UILLIAS VOLKART DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE CODORNAS (*Coturnix coturnix japonica*) COMO
HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *Neospora caninum***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Dias Munhoz

**ILHÉUS – BAHIA
2012**

O48 Oliveira, Uillians Volkart de.
Caracterização de codornas (*Coturnix japonica*) como hospedeiro intermediário de *Neospora Caninum* / Uillians Volkart de Oliveira. - Ilhéus : UESC, 2012.
xiv, 47f. : il. ; anexos.
Orientador : Alexandre Dias Munhoz.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Inclui referências.

1. Codorna – Hospedeiro – Parasito. 2. Codorna – Pragas e doenças. 3. Cães – Hospedeiro – Parasito. 4. *Neospora Caninum*. I. Munhoz, Alexandre Dias (orientador). II. Título.

CDD – 636.594

UILLIANS VOLKART DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE CODORNAS (*CUTURNIX CUTURNIX JAPONICA*) COMO
HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *NEOSPORA CANINUM***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Ilhéus/BA, ___/___/_____

DSc. Alexandre Dias Munhoz
(Orientador)

DSc. George Rego Albuquerque
(UESC)

DSc. Marcos Rogério André
(Unesp/Jaboticabal)

EPÍGRAFE

“Viver no mundo sem tomar consciência do significado do mundo é como vagar por uma imensa biblioteca sem tocar os livros.”

Dan Brown

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação especialmente à minha mãe Maria Tereza Volkart de Oliveira e ao meu pai José Alves de Oliveira, que foram as pessoas responsáveis pela minha chegada nesse mundo, além de terem contribuído de várias formas na minha educação, que foi de fundamental importância para o meu desenvolvimento com ser humano.

Aos meus irmãos Wagner Volkart de Oliveira e Erweuter Volkart de Oliveira, que junto de meus pais, influenciaram a minha introdução e passagem na academia do conhecimento, sendo fundamental para a minha formação pessoal e intelectual.

Faço valer deste espaço para também dedicar esta dissertação a uma grande amiga, Isis Vanilde Leite Souza (*in memoriam*), que por razões que jamais irei compreender em vida, não permitiu que ela pudesse finalizar este projeto e nem presenciar fisicamente esse momento. No entanto prefiro acreditar que Deus sabe o que faz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por minha entrada neste mundo, por uma família, por amigos, pelos meus mestres, por uma boa educação e pela grande oportunidade de desfrutar deste conhecimento existente.

Ao professor Alexandre Dias Munhoz, que foi meu orientador desde a iniciação científica, que me deu a oportunidade de desenvolver trabalhos tanto na área de pesquisa quanto na extensão em seu laboratório, e dessa forma fazendo com que desenvolvesse meu conhecimento e senso crítico. E desta forma me deixando mais seguro para tomar decisões que serão de fundamental importância para o meu futuro.

As primeiras pessoas que me acolheram no laboratório em minha chegada, Luciana Carvalho e Ricardo Rossi Rodriguês, e que me deram as primeiras notas para que eu pudesse começar interagir melhor com o ambiente de trabalho. Assim também como a técnica Joíra que ofereceu grande suporte ao laboratório, e Wanessa Camboim, logo depois.

Ao Gideão Silva Galvão, por ter sido a primeira pessoa que acompanhei em um projeto de pesquisa, sendo também uma das influências que tive para que permanecesse na academia.

Assim também como os novos colegas e amigos, Clebson Pereira de Almeida, Ivanildo dos Anjos Santos, Ludimila Santos Macêdo, Aisla Nascimento e Danielle Andrade Mota que foram mais do que simples alunos de Iniciação Científica, pois participaram diretamente no desenvolvimento da minha formação profissional e pessoal, assim como tive a oportunidade de fazer o mesmo por eles. Lembro também das alunas de iniciação científica júnior Livia Amanda e Luíza Rosa, apesar do pouco tempo que passaram estiveram presentes nesse grupo.

Agradeço também a professora Sônia Lopo, que nós possibilitou a utilização de sua propriedade para o desenvolvimento de pesquisas científicas e aulas práticas, e desta forma ampliando e fortalecendo o nosso conhecimento. A mestre e amiga Vanessa Carvalho Sampaio de Magalhães pela grande ajuda que me ofertou nesse período em que estive presente, mesmo diante de circunstâncias adversas.

Ao pessoal do TVT, da Clínica de Pequenos Animais, da Clínica de Grandes, dos Animais Silvestres, dos Peixes pela amizade e contribuição na formação.

Amigos que apesar da distância continuam sempre mantendo contato e apoio sempre quando possível: Diana Campos, Rosana Sousa, Fabio Josino, Sandro Modesto, Adriano Soares, Cleverson Silva, Clodoaldo Medeiros.

Aos colegas de República: João, Gustavo e Flávio pela convivência amigável nesse período complicado de nossa vida, estando em processo de formação profissional, e ao mesmo tempo já tendo que lidar com problemas do cotidiano.

Outras pessoas também muito especiais, que não puderam estar presentes, e aquelas que puderam estar presentes na defesa desta dissertação, que ainda não haviam sido lembradas: Helka Dwyer, Joab Mandelo, Tainá Coutinho, Leandro Viana, Milena Torres, Rosana Lopez, Izabela Garcia e Thaise de Oliveira Costa.

A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) por toda infraestrutura que me foi ofertada em todos esses anos em que estive presente.

CHARACTERIZATION OF QUAILS (*COTURNIX CUTURNIX japonica*) AS intermediate host of *Neospora caninum*

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar codornas (*Coturnix coturnix japonica*) como hospedeiro intermediário de *Neospora caninum*. Cinquenta e oito codornas, com vinte dias de vida, foram identificadas individualmente com anilhas numeradas e mantidas em gaiolas próprias para a espécie. As aves eram alimentadas com ração comercial e água destilada *ad libitum*, tendo seu peso e temperatura cloacal aferidos diariamente no primeiro mês e posteriormente, seu peso, a cada sete dias durante mais 30 dias. As aves foram divididas de forma aleatória, em três grupos: 40 codornas (Grupo A) receberam $3,5 \times 10^6$, taquizoítas de *N. caninum* por via subcutânea, 8 codornas (Grupo B) receberam 5×10^6 e 10 codornas (Grupo C) receberam placebo. As codornas do grupo A e C tiveram seu sangue colhido e foram eutanasiadas nos dias 1º, 3º, 5º, 7º, 14º, 21º, 30º, 60º, 120º, dias após infecção (DAI), sendo quatro do grupo A e uma do grupo C. As codornas do grupo B foram eutanasiadas no 60º DAI e 120ºDAI. As amostras de sangue foram centrifugadas e soro retirado e armazenados em criotubos à -20°C para a realização da sorologia. Após a eutanásia as aves foram necropsiadas e os órgãos: baço, bursa de fabricius, cérebro, cerebelo, coração, fígado, língua, musculatura peitoral, ovário, pulmões e rins foram pesados e fragmentos separados e devidamente acondicionados para realização da histopatologia, imunohistoquímica (IHQ) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). No 60º DAI dois cães foram alimentados com tecidos de codornas do grupo A, enquanto um cão foi alimentado com tecidos das codornas do grupo B, o sangue destes animais foi colhido semanalmente para sorologia e suas fezes colhidas semanalmente para identificação microscópica e molecular de oocistos. Para comparar o peso dos órgãos, temperatura cloacal e das codornas utilizou-se o teste *t* de Student. Nenhuma das codornas apresentou sinal clínico ou veio a óbito. Esplenomegalia e hepatomegalia foram achados de necropsia na primeira semana de infecção ($p < 0,05$). Sorologia positiva, imunoreatividade pela IHQ e a identificação molecular do parasito foram observadas, em órgãos das codornas, principalmente nas duas primeiras semanas de infecção. Nenhum cão eliminou oocistos ou soroconverteu. As codornas infectadas apresentaram ganho de peso superior em relação às codornas controles. Os resultados observados demonstram que codornas são resistentes a infecção com taquizoítas de *N. caninum* nas condições deste trabalho.

Palavras-Chave: aves, cães, codornas, *Neospora caninum*.

ABSTRACT

This study aimed to characterize quail (*Coturnix coturnix japonica*) as an intermediate host of *Neospora caninum*. Fifty-eight quails, with twenty days old, were individually identified with numbered plates and kept in cages suitable for the species. The birds were fed with commercial feed and distilled water *ad libitum*, and their weight and cloacal temperature measured daily in the first month and subsequently, its weight, every seven days for 30 days. The birds were divided randomly into three groups: 40 quail (Group A) received 3.5×10^6 tachyzoites of *N. caninum* subcutaneously 8 quail (Group B) received 5×10^6 quail and 10 (Group C) received placebo. The quails in group A and C had their blood drawn and were euthanized on days 1, 3, 5, 7, 14, 21, 30, 60, 120, days after infection (DAI), four from group A and group C. The quails in group B were euthanized at 60 ° and 120 ° DAI DAI. Blood samples were centrifuged and serum removed and stored in cryotubes at -20°C to perform serology. After euthanasia, the birds were necropsied and organs: spleen, bursa of Fabricius, brain, cerebellum, heart, liver, tongue, musculatua breast, ovary, lungs and kidneys were weighed and separated fragments and packaged appropriately for performing the histopathology, immunohistochemistry (IHC) and by the Polymerase Chain Reaction (PCR). On the 60th DAI two dogs were fed tissues of quails in group A, while a dog was fed tissues of quails in group B, the blood of these animals was collected weekly for serology and feces collected weekly for microscopic identification and molecular oocysts. To compare the weight of the organs, cloacal temperature, and the quails used the Student t test. None of the quail showed clinical signs or had died. Splenomegaly and hepatomegaly were necropsy findings in the first week of infection ($p < 0.05$). Serology positive immunoreactivity by IHC and molecular identification of the parasite were observed in organs of quail in the first two weeks of infection. No dog or eliminated oocysts seroconverted. The infected quail showed higher weight gain compared to controls quail. The results observed showed that quail are resistant to infection with tachyzoites of *N. caninum* in the conditions of this work.

KEYWORDS: birds, dogs, quail, *Neospora caninum*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Peso médio das codornas infectadas experimentalmente com taquizoítos de *Neospora caninum* (grupos A e B) em relação as codornas do grupo controle..... 19
- Figura 2 Temperatura média das codornas infectadas experimentalmente com taquizoítos de *Neospora caninum* (grupos A e B) em relação as codornas do grupo controle..... 20
- Figura 3 Variação no tamanho dos órgãos de codornas infectadas experimentalmente com taquizoítos de *Neospora caninum*. A=Baço de uma codorna infectada do 3º dia após infecção (DAI) e; B= Fígado de uma codorna infectada do 3º DAÍ (em ambos os casos à comparação com o mesmo órgão de uma codorna controle..... 21
- Figura 4 Titulos médios de anticorpos de codornas infectadas experimentalmente Com Taquizoítos de *Neospora caninum*..... 24
- Figura 5 Imunoreatividade em órgãos de codornas infectadas experimentalmente por *N.caninum*: (A) baço, 1º DAI, (B-E) fígado, músculo peitoral, pulmão e cérebro, respectivamente de codornas do 3º DAI, (F) Bursa de fabricius, do 5º DAÍ (G) coração, 7º DAI e, (H) língua , 14º DAI, (1000 x)..... 26
- Figura 6 Achados histopatológicos em codornas infectadas experimentalmente com *Neospora caninum*. A= Infiltrado inflamatório

mononuclear em uma codorna do 3 DAÍ (H&E), 400x; B= Infiltrado
inflamatório da mesma codorna com marcações positivas (IHQ),
400x..... 27

Figura 7 Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em amostras de
codornas experimentalmente infectadas..... 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios dos pesos relativos dos órgãos das codornas infectadas experimentalmente com <i>Neospora caninum</i> em relação as codornas controles.....	23
Tabela 2	Relação de codornas positivas para <i>N. caninum</i> perante as técnicas de RIFI, IHQ e PCR.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
IHQ	Imunohistoquímica
SNC	Sistema Nervoso Central
(IFN- γ)	Interferon gama
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
H&E	Hematoxilina-Eosina

Sumário

1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 HISTÓRICO.....	3
2.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E BIOLOGIA	3
2.3 CICLO BIOLÓGICO	4
2.4 PATOGENIA E IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO	5
2.5 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR <i>Neospora caninum</i>	6
2.6. AVES COMO MODELOS EXPERIMENTAIS	7
2.7 CODORNAS.....	10
3. OBJETIVO	11
3.1 OBJETIVO GERAL	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS CODORNAS	12
4.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CODORNAS POR TAQUIZOÍTOS COM <i>NEOSPORA CANINUM</i>	12
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS	13
4.4 ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS CÃES.....	13
4.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS CÃES COM <i>N. caninum</i>	14
4.6 COLHEITA DE AMOSTRAS PARA EXAMES SOROLÓGICOS DOS CÃES	14
4.7 REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA <i>N. caninum</i>	14
4.8. EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS.....	15
4.9. EXAME HISTOPATOLÓGICO DAS CODORNAS	16
4.10. REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).....	16

4.11. EXTRAÇÃO DE DNA DOS TECIDOS DAS CODORNAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS.....	17
4.12. EXTRAÇÃO DO DNA DAS FEZES DOS CÃES	17
4.13. DETECÇÃO DE DNA DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> PELA PCR EM FRAGMENTOS DE TECIDOS DE CODORNAS E DAS FEZES DO CÃES, EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR <i>NEOSPORA CANINUM</i>	17
4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. MANUTENÇÃO, PESO E TEMPERATURA DAS CODORNAS.	19
5.2. PESO DOS ORGÃOS DAS CODORNAS.....	20
5.3. SOROLOGIA PARA <i>N. caninum</i>	20
5.4. EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS.....	21
5.5. REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).....	21
5.6. RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA (HE).....	21
5.7. DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>N. caninum</i> EM TECIDOS DE CODORNAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS POR MEIO DA PCR.....	24
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO	32
8. AGRADECIMENTOS.....	33
9. REFERÊNCIAS.....	34
10. ANEXOS	41
ANEXO 10.1. EXTRAÇÃO DE DNA DO TECIDOS DAS CODORNAS	41
ANEXO 10.2. EXTRAÇÃO DO DNA DAS FEZES DOS CÃES QUE INGERIRAM TECIDO DE CODORNAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS POR <i>NEOSPORA CANINUM</i>	43
ANEXO 10.3 REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	45
ANEXO 10.4. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DOS CÃES E DAS CODORNAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR <i>NEOSPORA CANINUM</i>	47

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário intracelular, de ciclo heteróxico obrigatório, pertencente ao filo: Apicomplexa, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae que inclui diversos gêneros (FAYER et al., 1980; DUBEY et al., 1988a), sendo responsável pela infecção em mamíferos (DUBEY & LINDSAY, 1996; HEMPHILL & GOTTSTEIN, 2000; VOGEL et al., 2006) e aves (MCGUIRE et al., 1999; FURUTA et al., 2007; COSTA et al., 2008; MINEO et al., 2009; MARTINS et al., 2011; MINEO et al., 2011; MOLINA-LOPEZ et al., 2011).

A relação entre *N. caninum* e aves vem sendo explorada em infecções experimentais (BAKER et al., 1995; MCGUIRE et al., 1999; FURUTA et al., 2007, MINEO et al., 2009), naturais (MARTINS et al., 2011; MOLINA-LÓPEZ et al., 2011; MINEO et al., 2011), bem como em estudos observacionais (OULD-AROUMCHE et al., 1998; BARTELS et al., 1999; OTRANTO et al., 2003). No entanto ainda restam lacunas a serem preenchidas a respeito do papel e importância das aves no ciclo de *N. caninum*.

O primeiro estudo objetivando verificar a relação entre aves e *N. caninum* tentou sem sucesso caracterizá-las como hospedeiros definitivos de *N. caninum* (BAKER et al. 1995), embora alguns estudos observacionais associaram a presença destas com a soropositividade (OULD-AROUMCHE et al., 1998; OTRANTO et al., 2003) e abortamento em vacas (BARTELS et al., 1999) remetendo a possibilidade das aves funcionarem como potencial hospedeiro intermediário. Assim trabalhos foram conduzidos e permitiram identificar *N. caninum* no tecido de aves tanto experimentalmente infectadas (MCGUIRE et al., 1999; FURUTA et al., 2007, MINEO et al., 2009), quanto naturalmente (GONDIM et al., 2010; MOLINA-LOPEZ et al., 2011) o que remonta a possibilidade das aves agirem como hospedeiro intermediário, para o parasita sob estudo.

Como as galinhas foram caracterizadas como hospedeiros naturais (COSTA et al. 2008; GONÇALVES et al. 2010; MARTINS et al. 2011) do parasita, uma vez que seus ovos embrionados infectados foram capazes de induzir a liberação de oocistos em cães (FURUTA et al. 2007) e pelo fato de codornas serem consideradas

bons modelos biológicos (WILLIAMS, 1976; ICHILCIK & AUSTIN, 1978) e pertencerem à mesma ordem das galinhas (TOLWEB, 2012), suscitou a hipótese de que estas aves poderiam agir também como um bom hospedeiro para *N. caninum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Em 1984, na Noruega foi isolado um parasito em cães (BJERKAS et al., 1984), com histórico de encefalomielite, que vieram a óbito. Na microscopia observaram-se severa inflamação, necrose e presença de cistos com numerosos parasitos no sistema nervoso central (SNC) e musculatura esquelética. Os parasitos apresentavam morfologia semelhante ao *Toxoplasma gondii*, contudo os cães eram sorologicamente negativos e na microscopia eletrônica foram observadas diferenças ultra-estruturais significativas que o diferenciavam de *T. gondii* (BJERKAS & PRESTHUS 1988). Em 1988, Dubey et al. (1988a) caracterizaram o agente como *Neospora caninum*. Posteriormente estudos retrospectivos confirmaram a presença do agente em cães desde 1957 (DUBEY et al., 1990), com a confirmação de casos de encefalomielite que eram até então diagnosticados como toxoplasmose (DUBEY et al., 1988a). No mesmo ano em que o parasito foi caracterizado houve o isolamento do mesmo, em tecidos de cães com poliradiculoneurite e polimiosite (Dubey et al., 1988b). A partir deste isolamento, ensaios sorológicos e imunoistoquímicos passaram a ser desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico diferencial das infecções por *N. caninum* e *T. gondii*, permitindo o diagnóstico de *N. caninum* em uma grande variedade de animais (LINDSAY & DUBEY, 1989; UGGLA et al., 1989). No Brasil, o primeiro isolamento de *N. caninum*, foi realizado na Bahia em um cão da raça Collie, macho, de 7 anos de idade, que apresentava incoordenação e paralisia dos membros posteriores (GONDIM et al., 2001).

Embora a neosporose, doença causada por *N. caninum*, tenha sido descoberta no cão, a mesma assume especial relevância em bovinos, sendo uma das principais causas de aborto. A presença de propriedades com abortos esporádicos, endêmicos e epidêmicos devidos a neosporose é descrita por vários autores (THURMOND et al., 1997; WOUDA et al., 1997; WOUDA et al., 1998; SCHARES et al. 1999; SCHARES et al. 2002), com ocorrência durante todo o ano (DUBEY et al., 1999a).

2.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E BIOLOGIA

Neospora caninum é um protozoário intracelular, de ciclo heteroxeno obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (FAYER et al., 1980; DUBEY et al., 1988a), sendo responsável pela infecção em diversos animais tais como cães, roedores, pássaros, bovinos e outros herbívoros (DUBEY & LINDSAY, 1996; HEMPHILL & GOTTSTEIN, 2000; VOGEL et al., 2006).

Os cães (*Canis familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), dingos australianos (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e recentemente os lobos cinzentos (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011) foram descritos como hospedeiros definitivos de *N. caninum* por serem capazes de eliminar oocistos nas fezes.

O parasito possui três formas de infecção: taquizoítas (DUBEY, 1999a; LINDSAY & DUBEY, 2000), cistos (contendo bradizoítas) (DUBEY et al. 1988a) e os oocistos que quando esporulados, contém esporozoítas (McLLISTER et al., 1998). Os taquizoítas medem aproximadamente $6 \times 2 \mu\text{m}$, caracterizam-se pela multiplicação rápida intracelular, levando o hospedeiro a desenvolver uma infecção aguda. Os bradizoítas por sua vez medem $7 \times 2 \mu\text{m}$, e possuem uma parede de $4 \mu\text{m}$ (DUBEY et al. 1999a). Os oocistos, forma resistente do parasito no ambiente, podem medir $10,6-12,4 \times 10,6-12 \mu\text{m}$ de tamanho (DUBEY 2003), uma vez esporulados apresentam no seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítas cada (DUBEY et al., 1999a).

2.3 CICLO BIOLÓGICO

Os canídeos, hospedeiros definitivos (HD), são infectados ao consumir tecidos contendo cistos do parasito (MCALLISTER et al., 1998), principalmente nos tecidos do SNC e periférico (cérebro, medula espinhal e nervos), na musculatura cardíaca e esquelética, no tecido ocular, no fígado (DUBEY, 1999b; ANDERSON et al., 2000; CAVALCANTE et al., 2011) e placenta (DIJKSTRA et al., 2001) oriundos de hospedeiros intermediários. A parede do cisto é degradada pela ação do suco gástrico liberando as formas parasitárias (DUBEY & LINDSAY, 1996). Em seguida ocorre um provável desenvolvimento no intestino, com liberação dos oocistos nas fezes, que, uma vez esporulados no ambiente são capazes de infectar novos hospedeiros intermediários (MCALLISTER et al., 1998).

Ainda não se conhecem as estruturas e a localização dos estádios endógenos de *N. caninum* que dão origem à eliminação de oocistos. O período pré-patente é de cinco dias ou mais a partir da ingestão de cistos teciduais (LINDSAY et al., 1999). Uma vez ingeridos por hospedeiros intermediários os oocistos passam pelo estômago e duodeno, juntamente com o alimento, sofrem digestão química e enzimática e liberam os esporozoítas no trato gastrointestinal, estes se convertem em taquizoítas, tendo acesso as vias sanguíneas e linfáticas (MCALLISTER et al., 1998; DUBEY et al., 1999b; DUBEY, 2003).

A quantidade de oocistos excretados pelos cães varia de acordo com o tipo e origem do tecido animal infectado ingerido. Sabe-se que existe uma maior excreção de oocistos em cães alimentados com tecidos de bezerros infectados, quando comparada com cães que ingeriram tecidos de camudongos infectados (GONDIM et al., 2002; FERROGLIO et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2011).

Os taquizoítas podem se multiplicar rapidamente num processo freqüente de invasão celular, proliferação, lise da célula do hospedeiro e conseqüentemente, invasão de células vizinhas. Tudo isso conjugado com eventos imunopatológicos, resultando em lesões necróticas significativas dentro de tecidos lesados (DUBEY & DE LAHUNTA, 1993), o que pode culminar com uma enfermidade neuromuscular severa em decorrência da destruição de células neurais, afetando a condutividade nervosa (DUBEY & DE LAHUNTA, 1993). Tanto nas fases aguda como na crônica da infecção, o cérebro é o órgão de predileção, no qual se pode encontra a maior parte dos cistos formados pelo protozoário (BARR et al., 1994; McALLISTER et al., 1996; BUXTON et al., 1998)

A ocorrência da lesão dos tecidos pelos taquizoítas depende de um equilíbrio entre a capacidade do parasito de penetrar e se multiplicar em células dos hospedeiros e a habilidade do sistema imune destes em inibir a multiplicação. Assim o início da resposta imune e outros fatores fisiológicos irão influenciar a conversão dos taquizoítas em bradizoítas, e a formação de cistos teciduais (BUXTON et al., 2002).

2.4 PATOGENIA E IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO

A localização intracelular do *N. caninum* nos hospedeiros sugere que a imunidade mediada por células possa ser importante para a proteção do hospedeiro

frente ao parasito. Vacas não prenhes desafiadas com o parasito geralmente não desenvolvem sintomas clínicos da doença e os estudos das suas respostas imunológicas demonstram que ocorre uma proliferação periférica das células mononucleares sangüíneas em resposta aos antígenos deste parasito, com produção de interferon gama (IFN- γ) (LUNDEN et al., 1998.; MARKS et al., 1998).

Em sua fase aguda, os taquizoítas multiplicam-se rapidamente, preferencialmente em células mononucleares macrófágicas presentes na corrente sanguínea, possibilitando uma rápida disseminação pelo organismo. Ao se instalarem nos órgãos, o parasito prossegue no mesmo compasso de multiplicação, destruindo o tecido parasitado e cedendo lugar a uma reação inflamatória. Ao alcançar o cérebro ou tecido esquelético, o parasito volta na forma de bradizoíta na qual começa a se agrupar e se multiplicar lentamente, secretando proteínas que impermeabilizam a parede do cisto, protegendo tais estruturas da resposta imune do hospedeiro (COLLANTES FERNANDEZ et al., 2006). Os bradizoítas alojados nos cistos tissulares do SNC podem reativar-se devido a influencia hormonal e imunológica do hospedeiro dando origem a nova parasitemia (DUBEY, 1999a; BUXTON et al., 2002; DUBEY, 2003).

2.5 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR *Neospora caninum*

A exposição ao *N. caninum* pode ser demonstrada mediante a utilização de técnicas sorológicas, histopatológicas e moleculares com ênfase para a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (DUBEY, 1999a; 2003), técnica esta que possibilita a diferenciação deste protozoário de outros pertencentes ao mesmo filo, devido as suas características moleculares (DUBEY, 1988a).

As técnicas sorológicas disponíveis são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), Aglutinação Direta, e Eletroforese Combinada com Imunodeteção (DUBEY, 1999a; 2003). Enquanto a RIFI em tecidos (FURUTA et al., 2007), Histopatologia (ANDERSON, 2000) e a Imunohistoquímica (DUBEY et al. 1988a) são consideradas técnicas de visualização direta do parasito e de seus antígenos.

As técnicas de biologia molecular têm sido imprescindíveis para o diagnóstico das infecções e diferenciação dos parasitos coccídios relacionados (Sreekumar et al., 2003; Costa et al., 2008). As reações de PCR, seguida pelo seqüenciamento do

DNA genômico, é conclusiva para a identificação do parasito em amostras de tecidos ou em fezes. Neste contexto a *nested PCR* tem apresentado uma eficácia maior que a PCR convencional em amostras de campo, mostrando maior sensibilidade e tornando-se bastante útil para a detecção de parasitas em amostras que apresentam pequenas quantidades do DNA alvo (BARRAT et al., 2008; SILVA et al., 2009; GONDIM et al., 2010).

2.6. AVES COMO MODELOS EXPERIMENTAIS

Estudos epidemiológicos foram de grande importância para servir de embasamento científico e estimular as pesquisas sobre este tema. Ould-Amrouche et al. (1998) realizaram um estudo transversal em 42 propriedades na região da Normandia na França, encontrando uma associação significativa entre vacas soropositivas e a presença de patos, porém os autores explicam que esse resultado poderia estar relacionado a baixa soropositividade de vacas que foi encontrada neste estudo. Na Holanda, Bartels et al. (1999) investigaram possíveis fatores de risco associados ao aborto em 47 propriedades leiteiras e encontraram uma associação positiva entre galinhas, patos e gansos em propriedades com epidemia de abortos, lançando a hipótese de que as aves poderiam ser possíveis vetores dos oocistos ou então que os cães poderiam adquirir a infecção ao se alimentar de aves infectadas. Ainda, na Itália, foi observada uma associação significativa entre a soropositividade em bovinos e a presença de aves e cães (OTRANTO et al., 2003).

Neospora caninum tem sido detectado em aves de forma natural ou experimentalmente infectadas, tais como pombos (*Columbia livia*) (MCGUIRE et al., 1999; MINEO et al., 2009), galinhas (*gallus domesticus*) (COSTA et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010; MARTINS et al., 2011) e seus ovos embrionados (FURUTA et al., 2007; MANSOURIAN et al., 2009; NAVAMARI et al., 2011), pardais (*passer domesticus*) (GONDIM et al., 2010), corvos (*Corvus corax*) (MOLINA LÓPEZ et al., 2011), Arara (*Ara Chloropterus*), papagaio (*Amazona aestiva*) (MINEO et al., 2011) urubus (*Buteo buteo*) e gralhas (*Pica pica*) (DARWICH et al., 2011).

O primeiro estudo objetivando verificar a relação entre aves e *N.caninum* tentou sem sucesso caracterizá-las como hospedeiros definitivos de *N. caninum* (BAKER et al. 1995) investigaram o possível potencial do falcão vermelho (*Buteo jamaicensis*), abutre da Turquia (*Cathartes aura*), coruja de suindara (*Tyto Alba*) e o

corvo americano (*Corvus brachyrhynchos*) como possíveis hospedeiros definitivos de *N. caninum*. Neste estudo foram oferecidos camundongos inoculados com 1×10^5 taquizoítas de *N. caninum* para as aves. Oocistos com morfologia característica de parasitos do gênero *Isospora* foram encontrados nas fezes das aves, no entanto os mesmos não foram infectantes para os camundongos, concluindo-se que as espécies testadas não teriam potencial de serem hospedeiro definitivo de *N. caninum*.

Mcguire et al. (1999) em busca de vias alternativas para o ciclo de *N. caninum* infectaram experimentalmente com a amostra de taquizoítas, misturados na proporção de 1:1 da cepa NC2 (HAY et al., 1990) e NC-Liverpool (BARBER et al., 1995), as aves pertencentes a ordem *Columbiformes* representada pelos pombos (*Columbia livia*) e a dos *Passeriformes* pelos diamantes mandarinos (*Taeniopygia guttata*, anteriormente *Poephila guttata*). Todos foram eutanasiados 6 semanas após a inoculação; sendo coletado somente sangue dos pombos antes da inoculação e no momento da eutanásia. Os pombos foram positivos para *N. caninum* na sorologia, PCR, isolamento em cultura de células e na histopatologia ao contrário dos diamantes mandarinos que não foram positivos em nenhuma destas análises.

Furuta et al. (2007) realizaram infecção experimental em frangos domésticos, utilizando a amostra NC-1 (Dubey et al., 1988a). Sendo utilizados 5 grupos com 10 aves com 7 dias de vida, onde cada grupo recebeu diferentes concentrações de taquizoítas de *N. caninum* (1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e controle) por via intraperitoneal. Aos 15 dias após infecção três animais de cada grupo foram eutanasiados e os restantes reinoculados com 1×10^7 taquizoítos da mesma cepa. Das aves realizou-se sorologia e as amostras de cérebro, coração, pulmão, baço, fígado, olho e musculatura peitoral foram colhidas para IHQ. Observou-se animais soropositivos para RIFI e positivos para IHQ até o 15 dia após infecção.

Mineo et al. (2009) inocularam quatro pombos (*Columbia livia*), com 1×10^7 taquizoítos de *N. caninum* pertencentes a amostra NC-1 pela via intraperitoneal. Os autores observaram sorologia positiva, tendo que uma ave atingindo títulos de 1:640 enquanto que as restantes obtiveram títulos abaixo de 1:200 e através da IHQ identificaram marcações no pulmão, coração, sistema nervoso central, fígado, baço e rim de um dos pombos que veio a óbito no 25º DAI, onde concluíram que estas aves podem ser um bom modelo experimental para *N. caninum*.

Costa et al. (2008) observaram que galinhas em criação extensiva aprestaram 23,5% de soropositividade enquanto que as confinadas apenas 1,5%. Gonçalves et al., (2010) adquiriram 100 galinhas caipiras de propriedades situadas num raio de 300km da cidade de Salvador. As aves tiveram seu sangue colhido e em seguida foram eutanasiadas, sendo cérebro e coração colhidos para detecção do DNA do parasito. Ao final 17 aves encontravam-se soropositivas para *N. caninum* e em seis aves detectou-se DNA do parasito, contudo no bioensaio não houve o isolamento de *N. caninum*, reforçando a dúvida sobre a eficiência de transmissão do parasito de aves para outras espécies.

Gondim et al. (2010) ao realizarem a PCR do cérebro e coração de 40 pardais (*passer domesticus*) coletados nos estados da Bahia e Pernambuco, identificaram o DNA de *N. caninum* em 3 (7,5%) destes, sendo o primeiro relato de uma ave selvagem ou silvestre naturalmente infectada por *N. caninum*. Na região da Catalunha na Espanha foi realizado um estudo soropidemiológico por Molina-López et al. (2011) em 67 corvos (*Corvus corax*) que passaram por uma sorologia para *N. caninum*, com 24 foram positivos, todos com menos de um ano de idade, obtendo assim uma prevalência de 35,8% de soropositividade para este parasito nessa região. Darwich et al. (2011) coletaram o cérebro de 201 aves mortas pertencentes a 14 espécies diferentes, porém encontraram apenas três amostras positivas sendo duas de gralhas e uma de urubu.

Mineo et al. (2011) ao analisarem 294 aves pertencentes a 9 ordens diferentes encontraram cistos em apenas duas espécies, sendo um cisto na musculatura da cloaca de uma arara verde (*Ara Chloropterus*) e na musculatura cervical de um papagaio azul (*Amazona aestiva*) que vieram á óbito (devido a condições clínicas não relacionadas com parasitos do Filo Apicomplexa) e foram necropsiadas, o que torna um achado pouco comum, já que essas estruturas não são facilmente visualizadas em aves, e sim no tecido do SNC de cães e ruminantes (Dubey et al., 2002), assim com em tecido muscular (Bjerkas et al., 1984; Peters et al., 2001), o que comprova, que *N. caninum* possa ser encontrado em aves selvagens no seu estado latente (Mineo et al., 2011).

Em algumas espécies e ordens que já passaram por investigações não foi possível encontrar indícios que comprovassem a exposição destas a *N. caninum*: Zebra finches (*Taeniopygia guttata*) (MCGUIRE et al., 1999), (*Taeniopygia guttata* Eurasina jay (*Garrulus glandarius*), Griffon vulture (*Gyps fulvus*), Black kite (*Milvus*

migrans) (DARWICH et al., 2011), *Coragyps atratus* (Ciconiformes), *Zenaida auriculata* (Columbiformes), *Caracara plancus* (Falconiformes), *Oryzoborus maximilian* (Passeriformes), *Serinus canária* (Passeriformes), *Ramphastos toco* (Piciformes), *Anodorhynchus hyacinthinus* (Psittaciformes), *Anodorhynchus leart* (Psittaciformes), *Ara ararauna* (Psittaciformes), *melopsittacus undulatus* (Psittaciformes), *Asto clamator* (Strigiformes), *Tyto Alba* (Strigiformes), *Rhea americana* (Rheiformes) e *Struthio camelus* (Struthioniformes) (Mineo et al., 2011).

No entanto ainda é necessário ter muita cautela para se afirmar se alguma destas aves possa de certa forma ter adquirido resistência a *N. caninum*, pois existem fatores como número de animais utilizados de cada espécie, técnica utilizada, idade, grau de exposição e ambiente que de certa forma acabam influenciando na resposta do parasito ao hospedeiro.

2.7 CODORNAS

As codornas são originárias do norte da África, da Europa e da Ásia, pertencendo à Ordem Galliforme e família Phasianidae, sendo portanto, da mesma família das galinhas e perdizes (PINTO et al., 2002). A *Coturnix coturnix coturnix*, ou codorna européia, foi introduzida no Japão, no século XI, a partir da China, via Coreia. Os primeiros escritos a respeito dessa ave datam do século XII, e registram que elas eram criadas em função do seu canto. Os japoneses, a partir de 1910, iniciaram estudos e cruzamentos entre as codornas, provindas da Europa, e espécies selvagens, obtendo-se assim um tipo domesticado que passou a ser chamar *C. c. japonica*, ou codorna doméstica (REIS, 1980).

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a dinâmica da infecção experimental com taquizoítos de *Neospora caninum* em codornas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os achados patológicos da infecção experimental de *N. caninum* em codornas;
- Caracterizar a codorna como hospedeiro intermediário para *N. caninum*
- Caracterizar a codorna como modelo biológico na manutenção de *N. caninum*
- Caracterizar a dinâmica de produção de anticorpos anti-*N. caninum* em codornas experimentalmente infectadas.
- Determinar o período pré-patente e a patência de *N. caninum* em cães após a ingestão de órgãos de codornas infectadas experimentalmente

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS CODORNAS

Cinquenta e oito codornas (*C. c. japonica*), com vinte dias de vida, foram adquiridas de um criatório comercial e instaladas no isolamento do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz. Este isolamento recebeu um vazão sanitário, além de ser higienizado por meio do uso de solução de hipoclorito de sódio (2%) e vassoura de fogo. As codornas foram identificadas individualmente com anilhas numeradas e mantidas em gaiolas próprias para a espécie. As aves eram alimentadas com ração comercial (Purina) e água destilada *ad libitum*, tendo seu peso e temperatura cloacal aferidos diariamente no primeiro mês e posteriormente a cada sete dias. As aves foram divididas de forma aleatória, em três grupos: 40 codornas (Grupo A), 8 codornas (Grupo B) e 10 codornas (Grupo C). Tendo o seu uso aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UESC) com o número de protocolo 033/09.

4.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CODORNAS POR TAQUIZOÍTOS COM *NEOSPORA CANINUM*

Foram utilizados taquizoítas de *N. caninum* do isolado NC-Bahia (GONDIM et al., 2001) cultivados em células CV-1 (fibroblastos renais de macaco verde africano). As células CV-1 infectadas e não infectadas foram cultivadas a 37°C em 5% de CO₂, utilizando meio RPMI 1640 (Sigma Co., EUA), contendo 10% de soro fetal bovino, até atingirem a confluência, quando foram infectadas com células CV-1 parasitadas. Em torno de 10 dias um grande número de taquizoítas encontrava-se no sobrenadante. Estes foram colhidos, passado em seringa com agulha para liberação dos parasitos intracelulares restantes, recolhidos em tubos cônicos e centrifugados a 1000g por 10-minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) com pH 7,2. A suspensão de taquizoítas resultante foi mensurada em câmara de Neubauer, para obtenção do inóculo.

O grupo A recebeu $3,5 \times 10^6$ de taquizoítas de *N. caninum*, enquanto que o grupo B 5×10^6 e o Grupo C placebo, composto por PBS. Em todos os inóculos foi

adicionado penicilina na concentração de 10000 U e foi utilizado a via subcutânea nas codornas.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

As codornas do grupo A e C tiveram seu sangue colhido pela veia jugular e foram eutanasiadas nos dias 1º, 3º, 5º, 7º, 14º, 21º, 30º, 60º, 120º, dias após inoculação (DAI), sendo quatro do grupo A e uma do grupo C, com exceção do 60º DAI em que oito codornas do grupo A foram eutanasiadas, e as codornas do grupo B que tiveram quatro codornas eutanasiadas no 60º DAI e 120º DAI. As eutanásias ocorreram conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Ética e Bem-Estar Animal. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos, tiveram o seu soro retirado e armazenados em criotubos à 20°C para a realização da RIFI. Após a eutanásia as aves foram necropsiadas e os seguintes órgãos retirados: baço, bursa de fabricius, cérebro, cerebelo, coração, fígado, língua, musculatura peitoral, ovário, pulmões e rins. Estes órgãos e as carcaças foram pesados, com exceção da língua e musculatura peitoral, e tiveram os seus fragmentos separados em 100 mg, exceto o baço cujo fragmento variou de 30-100mg, devido ao baixo peso apresentado em algumas aves, e transferidos para criotubos previamente esterilizados e identificados, onde foram estocados a -80°C para a realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Parte destes órgãos foi acondicionada em solução de formalina tamponada a 10% entre 24 a 48 horas, com posterior fixação em solução de álcool etílico a 70% para realização da histopatologia (H&E) e imunohistoquímica (IHQ).

4.4 ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS CÃES

Antes da chegada dos cães foi realizado um vazio sanitário nas baias, com desinfecção no canil com solução de formaldeído a 1%, hipoclorito de sódio a 2% e a utilização de vassoura de fogo. Três cães fêmeas, híginas, sem raça definida, com dois meses de idade, obtidas do Centro de Controle de Zoonoses de Itabuna foram acondicionadas em canis para a espécie preconizando o bem estar animal.

Os cães foram vacinados contra Cinomose, Parvovirose, Coronavirose, Adenovírus tipo 2, Parainfluenza, Hepatite Infeciosa Canina, e Leptospirose com

três doses a cada 30 dias e tratamento anti-helmíntico (Dontral plus®, dose única 330mg) e mantidos com ração comercial e água destilada *ad libitum*. Com realização de sorologia para *N.caninum* antes do experimento.

4.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS CÃES COM *N. caninum*

Antes de serem infectados os cães foram mantidos em jejum alimentar por 12 horas. Os animais foram alimentados com o "pool" de tecidos das codornas eutanasiadas no 60º DAI. Dois cães foram alimentados com tecidos de codornas do grupo A, enquanto um cão foi alimentado com tecidos das codornas do grupo B. O "pool" de tecidos oferecido para dois cães (grupo A) foi composto por 3g de cérebro mais cerebelo, 344g de musculatura peitoral, 14g de coração, 10g de pulmão, 36g de fígado, 11g de rins, 16g de ovário e 0,127g de bursa de fabricios totalizando 437g de tecidos de codornas do grupo A, sendo que cada animal alimentou-se com 218,52g de "pool" de tecido. Para o último cão (grupo B) o "pool" se constituiu de 1,4g de cérebro mais cerebelo, 225g de musculatura peitoral, 8g de coração, 5,6g de pulmão, 17g de fígado, 6g de rins, 17g de ovário e 0,139g de bursa de fabricios finalizando com total de 281g de tecido das codornas do grupo B.

Nenhum dos cães foi eutanasiado, e todos os procedimentos realizados estavam de acordo com os princípios éticos em pesquisa com animais de laboratório, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e tendo o seu uso aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UESC) com o número de protocolo 033/09.

4.6 COLHEITA DE AMOSTRAS PARA EXAMES SOROLÓGICOS DOS CÃES

De cada cão foi colhido sangue por venopunção da veia jugular o que foi centrifugados a 1000 g por 5 minutos e o seu soro retirado e armazenado em criotubos para a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Estas colheitas foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após infecção. Os soros foram mantidos a uma temperatura de -20°C até a realização da sorologia.

4.7 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA *N. caninum*

As lâminas com taquizoítos de *Neospora caninum* foram retiradas do freezer e lavadas em (PBS) por 5 minutos, deixando-as secar em estufa mais 5 minutos.

A RIFI foi realizada de acordo com Yamane et al. (1997). O ponte de corte utilizado foi de 1:50 nos cães, sendo colocado 10µL de conjugado anti-IgG canino (Sigma®-Aldrich F4012 inc., USA)

A leitura foi realizada em microscópio Binocular BX 51 (Olympus™) com sistema de epifluorescência e aumento de 400x, considerando-se as reações positivas quando a fluorescência periférica total for observada em mais de 50% dos taquizoítos. Reações parciais ou apicais foram interpretadas como negativas. Como foram utilizados soro de cães (SICUPIRA et al., 2011) e galinhas positivas e negativas para *N. caninum* (GONÇAVES et al. 2010).

Para as codornas foi utilizado o mesmo protocolo com as algumas alterações. O ponte de corte foi de 1:10, solução de conjugado foi padronizada na proporção de 1:300 composta de 1 µL anti-IgG chicken (Sigma®-Aldrich F4137 inc., USA),

4.8. EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS

Três dias antes e diariamente por 30 dias após a alimentação dos cães com os tecidos de codorna, foi realizado exame de fezes pelo método de flutuação com solução de sacarose pelo método de Sheather (BENBROOK; SLOSS, 1965) modificado com centrifugação para identificação de oocistos de *N. caninum*.

Três alíquotas/dia (9 gramas de fezes) foram pesadas e homogenizadas em 15mL de água destilada em um Becker, o material foi filtrado em uma camada dupla de gaze e tamise e centrifugado a uma velocidade de 1000 g por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado, sendo acrescido 5 mL de solução saturada de açúcar (densidade 1,63) para facilitar a homogenização do *pellet* que posteriormente foi completado até o volume do tubo.

Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 1000 g por 10 minutos, e adicionada solução saturada até a formação de um menisco convergente, sendo coberto com uma lamínula, de forma que a lamínula teve contato com o conteúdo do tubo. Deixou-se em repouso por 5 minutos, sendo depois retirada a lamínula com movimento uniforme e depositada sobre uma lâmina.

Os restantes das fezes dos cães passaram pelo mesmo procedimento anteriormente descritos, sendo o sobrenadante retirado, adicionada solução

saturada de açúcar e novamente centrifugados. O sedimento foi ressuspendido em solução de dicromato de potássio ($K_2CR_2O_7$) a 2% e mantido em temperatura ambiente e aeração forçada pelo período mínimo de dois dias, sendo utilizada constantemente uma bomba de aquário para este fim. Em seguida a solução foi retirada e mantidas a $-20^{\circ}C$ para a realização da extração de DNA.

4.9. EXAME HISTOPATOLÓGICO DAS CODORNAS

As amostras de tecidos fixadas em solução de álcool etílico 70% foram processadas conforme rotina convencional de processamento histopatológico, com desidratação em diluições crescentes de álcool etílico e diafanização em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica. Os cortes com $4\mu m$ de espessura foram feitos em micrótomo e colocados em lâmina de microscopia, as quais foram previamente tratadas com poli-L-lisina a 0,01%. As lâminas com os cortes foram mantidas em estufa a $60^{\circ}C$, por uma hora, e submetidas à desparafinização em xilol e reidratação em diluições decrescentes de álcool etílico.

4.10. REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Foi utilizado um protocolo semelhante ao de MINEO et al., (2009) com algumas modificações. Como anticorpo primário, um soro policlonal de um rato experimentalmente infectado por *N. caninum*, na diluição de 1:6000, incubado por 18 horas. Estes anticorpos foram identificados por meio do complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (LSAB) (Dako Denmark A/S, Denmark). E a reação foi revelada por meio da adição do cromógeno tetrahidrocloreto de diaminobenedina (DAB) (DakoCytomation™, Dinamarca). As lâminas tiveram o seu contraste atribuído à hematoxilina de Harris, sendo então desidratadas, imersas no xilol e montadas com Entelan.

A reação foi realizada em nos tecidos das codornas, que houve colheita durante a necropsia, durante o período do 1º até o 120 DAI. Como controles foram utilizadas lâminas com cortes histológicos de membrana de ovo infectadas e não infectadas com taquizoítos de *N. caninum* (Furuta et al., 2007). A leitura foi realizada em microscópio Binocular BX 51 (Olympus®) com aumento de 1000x.

4.11. EXTRAÇÃO DE DNA DOS TECIDOS DAS CODORNAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS

Previamente a extração do DNA foi adicionado nitrogênio líquido em cada um dos microtubos contendo os tecidos para que pudessem ser macerados com um bastão de vidro esterilizado. Após a maceração, tiveram o seu DNA extraído por meio da utilização de um kit comercial (Easy-DNA™ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme recomendações do fabricante (Anexo 1).

Após a extração as amostras de DNA foram estocadas à -20°C até a execução de reação da PCR.

4.12. EXTRAÇÃO DO DNA DAS FEZES DOS CÃES

Para tal utilizou-se o Kit DNA Stool Mini Kit, Qiagen, EUA (QIAGEN™). Após a adição do tampão de lise as amostras foram submetidas a oito ciclos de aquecimento (96°C) e resfriamento (-80°C) de um minuto cada e posteriormente agitadas em um vórtex por cinco minutos com 0,5g de pérolas de vidro (0,5mm), as demais etapas foram realizadas conforme orientação do fabricante (Anexo 2).

4.13. DETECÇÃO DE DNA DE *NEOSPORA CANINUM* PELA PCR EM FRAGMENTOS DE TECIDOS DE CODORNAS E DAS FEZES DO CÃES, EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *NEOSPORA CANINUM*.

As amostras foram quantificadas por espectrofotometria em espectrofotômetro 800XI (FEMTO), para que em seguida as amostras fossem diluídas em água ultrapura (Gibco) para que o DNA chegasse a uma concentração de 50 ng/μL para cada 10μL da amostra extraída.

Foi utilizado o DNA de taquizoítas de *N. caninum* do cultivo celular NC-Ba (GONDIM et al. 2001) como controle positivo da PCR. Para detecção do DNA de *N. caninum* da primeira reação foi utilizado os seguintes primers externos Np6 (5'CAGTCAACCTACGTCTTCT-3') e Np21 (5'GTGCGTCCAATCCTGTAAC3'), para a detecção do gene NC5 (YAMAGE et al., 1996). As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 25 μL: 5 μL de cada amostra de DNA, 0,5 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1mM de MgCl₂, 200 mM de mistura de dNTPs e Taq DNA Polimerase (Invitrogen 1U/reação), completando o volume com água destilada ultrapura. As amplificações foram conduzidas em um termociclador BioCicler MJ96G

com 40 ciclos programados para desnaturação (94°C/1 minuto), anelamento (52°C/1 minuto e 30 segundos) e extensão (72°C/1 minuto). As reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos e finalizados com uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Após as reações de amplificação, os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 2%. A corrida eletroforética foi realizada a 80 Volts e 180 miliamperes durante 30 minutos em tampão de corrida (TEB) pH 8,0. Um volume de 12 µL de cada amostra foi aplicado nas canaletas dos géis. Logo em seguida o gel foi introduzido em solução de brometo durante 15 minutos. Logo após os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotografados por um analisador e imagens acoplado (L-PIX, LOCCUS).

4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias do peso vivo, peso relativo dos órgãos (peso do órgão/peso da ave x 100) e temperatura corporal foram comparadas entre animais infectados e controles utilizando o teste *t* de Student, com nível de significância de 95%. Para comparação de média do peso relativo dos utilizou-se a seguinte metodologia: as codornas infectadas e eutanasiadas no 1º, 3º, 5º, 7º e 14º DAI tiveram suas médias comparadas com a média do peso relativo dos órgãos das codornas controles destes mesmos dias, sendo o mesmo procedimento adotado para comparação da média do peso relativo dos órgãos das codornas eutanasiadas do 21º, 30º, 60º e 120º.

5. RESULTADOS

5.1. MANUTENÇÃO, PESO E TEMPERATURA DAS CODORNAS.

As codornas se mostraram resistentes à infecção pelo *N. caninum* não tendo sido observado nenhum caso de morbidade ou mortalidade. A figura 1 demonstra o ganho de peso das codornas infectadas em relação a controle, onde se observa que os animais infectados apresentaram ganho de peso superiores a 20g no 30º DAI e a 30 g no 58º DAI. Sendo interessante observar também que as codornas do grupo B tiveram aumento discreto de peso em relação a codornas do grupo A, na **Figura 1**.

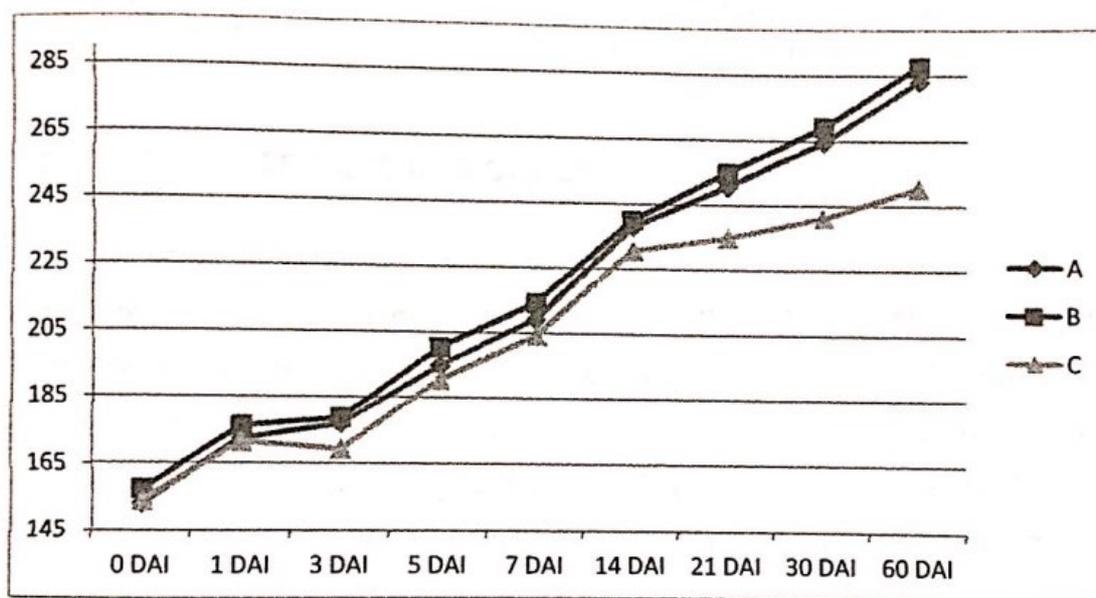


Figura 1. Peso médio das codornas infectadas experimentalmente com taquizoítos de *Neospora caninum* (grupos A e B) em relação às codornas do grupo controle.

As temperaturas das codornas mostraram um padrão irregular entre as codornas controles e infectadas até o 7º DAI, tendo a temperatura das codornas ascendendo e atingindo o seu pico no 14 DAI, havendo uma decadência logo após este período, mas mesmo assim estabilizando com uma média maior que a das codornas controles, como pode ser observado na figura 2.

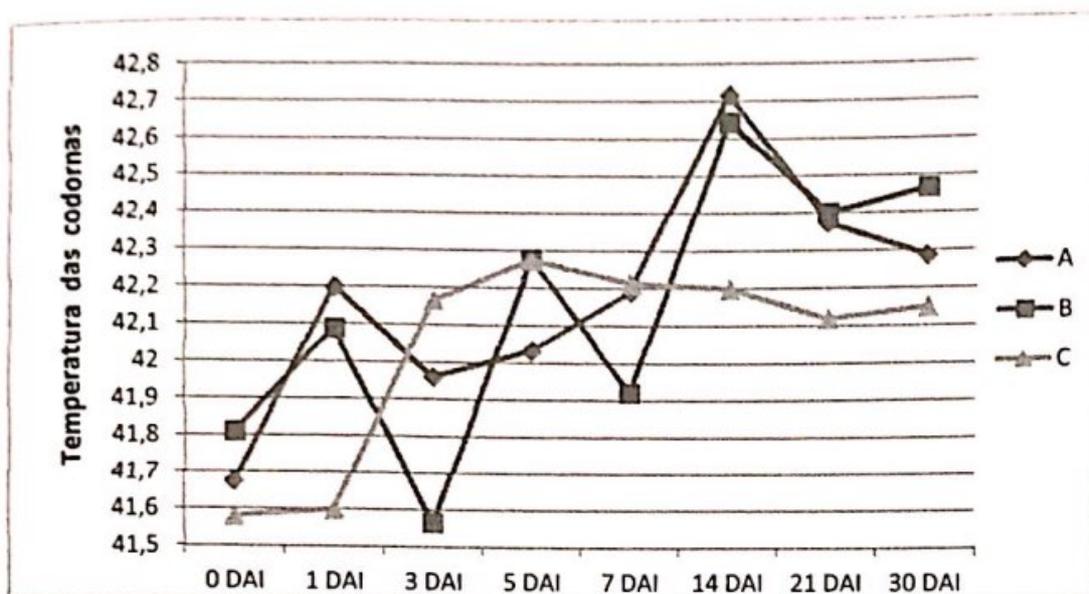


Figura 2. Temperatura média das codornas infectadas experimentalmente com taquizoítos de *Neospora caninum* (Grupo A e B) em relação as codornas do grupo controle.

5.2. PESO DOS ORGÃOS DAS CODORNAS

O valor médio relativo do peso do baço das codornas infectadas foram superiores aos do controle ($p < 0,05$), no 3º, 7º e 14º DAI, evidenciando *esplenomegalia* nas duas primeiras semanas de infecção (**Tabela 1, Figura 3**) embora o peso médio relativo do fígado nos animais infectados tiveram valores superiores a 500mg em relação a média das controles até o 7º DAI, o mesmo foi significativo ($p < 0,05$) apenas no 3º DAI (**Figura 3**). Como pode ser observado na **Tabela 1**.

5.3. SOROLOGIA PARA *N. caninum*

As codornas começaram a apresentar titulação a partir do 7º DAI onde uma codorna apresentou título 20 enquanto que três apresentaram uma titulação de 40. No 14º DAI todas as codornas foram soropositivas com titulações que variaram de 10 a 320. Tanto no 21º DAI quanto no 30º DAI, somente uma codorna foi soropositiva com título 10 Após o 30º DAI não foram observadas codornas soropositivas para *N.caninum*, (**Figura 4**),. Nenhuma codorna controle soroconverteu. Todos os cães alimentados com tecidos de codornas eutanasiadas no 60º DAI mantiveram-se soronegativos durante todo o período experimental.

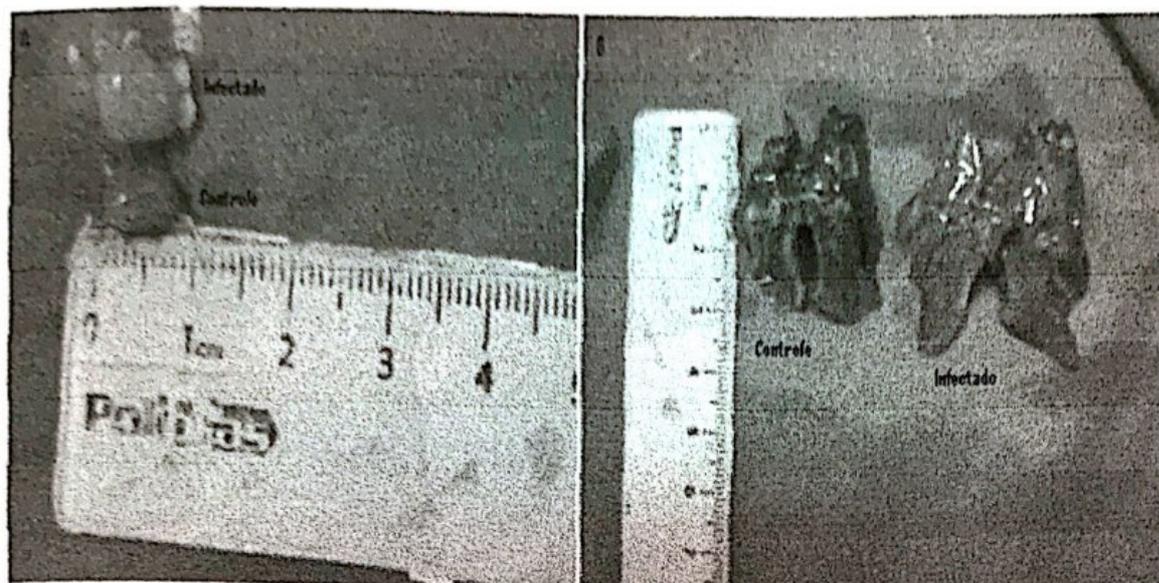


Figura 3. Variação no tamanho dos órgãos de codornas infectadas experimentalmente com taquizoítos de *Neospora caninum*. A=Baço de uma codorna infectada do 3º dia após infecção (DAI) e; B= Fígado de uma codorna infectada do 3º DAI (em ambos os casos à comparação com o mesmo órgão de uma codorna controle).

5.4. EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS

Não foi encontrado nenhum Oocisto nas fezes dos cães que foram examinadas, durante o período estabelecido.

5.5. REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Foram observadas imunoreatividade pela IHQ principalmente durante as duas primeiras semanas de infecção (**Figura 5**), sendo observada marcações nos tecidos de 15 codornas. Os órgãos imunoreativos em ordem decrescente foram bursa de fabricius (5), baço (4), fígado (4), cérebro (3), cerebelo (1), coração (1), língua (1), músculo peitoral (1) e o pulmão (1) e em apenas uma codorna infectada com 5×10^6 taquizoítos foi encontrada imunoreatividade no baço, no último dia de experimento. Totalizando 21 marcações, como pode ser observado tabela 2. Demonstrando uma preferência por órgãos do sistema fagocítico-monocítico seguido de tecido nervoso e muscular.

5.6. RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA (HE)

Apesar da ocorrência de infiltrados inflamatórios e hemorragias em órgãos como fígado, pulmão, coração e rins, além de outras patologias como esteatose hepática e apoptose de linfócitos na bursa de fabricius, não foi possível fazer uma correlação das mesmas com a presença do *N. caninum*, pelo fato das codornas controles terem mostrado os mesmos achados.

Tabela 1. Valores médios dos pesos relativos dos órgãos das codornas infectadas experimentalmente com *Neospora caninum* em relação as codornas controle.

Órgão	1°	3°	5°	7°	14°	21	30	60	120	Média 1	Média 2
Baço	0,08±0,03	0,10±0,02*	0,09±0,05	0,04±0,01*	0,08±0,02*	0,05±0,10	0,05±0,01	0,05±0,03	0,04±0,02	0,05±0,01	0,06±0,03
Bursa de											
Fabrícius	0,11±0,03	0,14±0,06	0,17±0,03	0,10±0,03	0,12±0,02	0,13±0,04	11±0,05	0,06±0,04	0,07±0,06	0,14±0,04	0,09±0,02
Carcaca	78,94±2,27	79,65±3,54	78,53±0,53	81,08±2,84	83,17±1,77	76,02±1,76	78,62±6,22	75,66±6,81	77,16±6,63	78,79±3,95	81,42±3,05
Cérebro	0,40±0,06	0,35±0,05	0,34±0,04	0,39±0,03	0,33±0,02	0,35±0,03	0,30±0,01	0,29±0,04	0,25±0,07	0,35±0,06	0,28±0,05
Coração	0,78±0,03	0,87±0,01	0,95±0,07	0,97±0,05	0,97±0,14	0,90±0,09	0,81±0,07	0,82±0,10	0,80±0,03	0,88±0,22	0,83±0,09
Fígado	2,62±0,47	3,20±0,32*	2,87±0,31	2,66±0,12	2,14±0,24	1,91±0,13	1,76±0,48	1,81±0,31	1,76±0,40	2,11±0,55	1,79±0,52
Pulmão	0,90±0,08	1,16±0,20	0,95±0,12	0,91±0,09	0,97±0,22	0,79±0,08	0,65±0,05	0,62±0,09	0,44±0,05	0,93±0,26	0,68±0,17
Rins	0,85±0,08	0,81±0,25	0,80±0,16	0,84±0,07	0,72±0,09	0,66±0,07	0,64±0,08	0,68±0,09	0,64±0,14	0,62±0,11	0,62±0,06

Tabela x: Média 1 = corresponde a média dos órgãos das codornas controle do 1 ao 14 DAI; Média 2: Corresponde a média dos órgãos das codornas controle do 21 ao 120 DAI; *p<0,05.

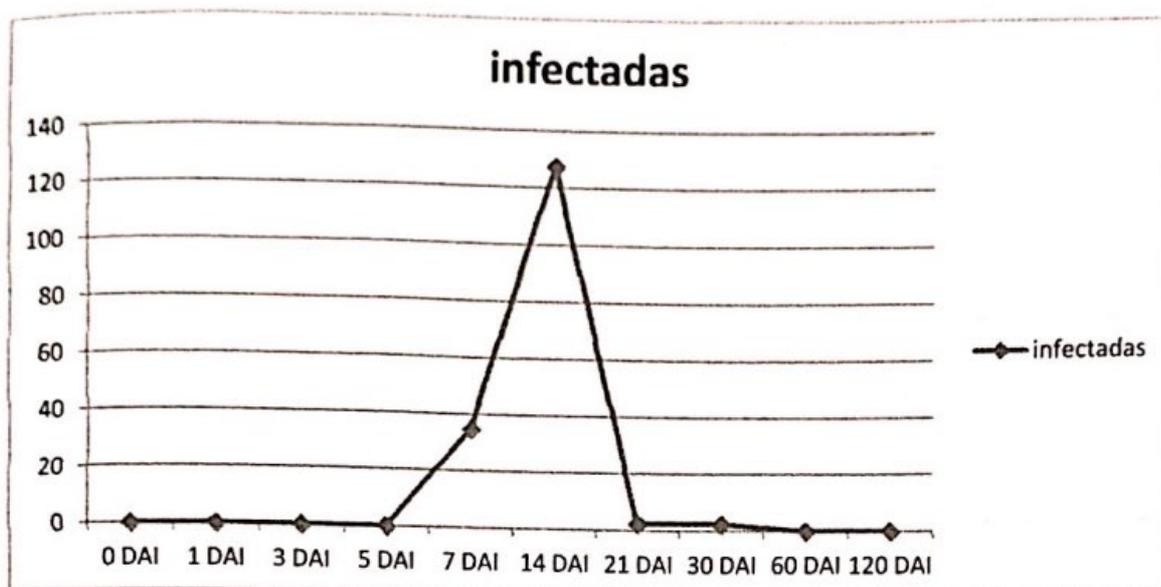


Figura 4. Títulos médios de anticorpos de codornas infectadas experimentalmente com taquizoítos de *Neospora caninum*. DAI

No fígado de 3 codornas infectadas, duas do 3 DAI e uma do 7 DAI, foi encontrado infiltrado inflamatório associado às marcações imunohistoquímicas, como pode ser observado na **Figura 6**. Tal associação não foi encontrado em nenhuma das codornas controles, apesar da ocorrência de infiltrado inflamatório nas mesmas.

5.7. DETECÇÃO MOLECULAR DE *N. caninum* EM TECIDOS DE CODORNAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS POR MEIO DA PCR.

Na PCR foi encontrado o DNA do parasito em sete codornas, principalmente nas duas primeiras semanas de infecção, sendo em um cérebro no 1º daí, no músculo peitoral e rins no 3º DAI no cérebro no 5º DAI, em um coração e um pulmão no 7º DAI e em um pulmão no 14º DAI. Observou-se amplificação no baço de uma codorna no 30º DAI em codornas infectadas com $3,5 \times 10^5$ taquizoítos de *N. caninum* e também observou-se amplificação no baço no 120º DAI de uma das codornas infectadas por 5×10^5 taquizoítos (tabela 2)..

Quanto a PCR do DNA das fezes dos cães, que ingeriram tecido de codornas infectados por *N. caninum*, não houve amplificação do DNA do parasito durante o período do estudo.

Tabela 2. Relação de codornas positivas para *Neospora caninum* perante as técnicas de RIFI, IHQ e PCR.

Técnica	Dias após infecção							
	1º	3º	5º	7º	14º	21º	30º	120º
RIFI	X	X	X	10(20)	17(20)	06(10)	55(10)	X
	X	X	X	41(40)	39(160)	X	X	X
	X	X	X	12(40)	11(320)	X	X	X
	X	X	X	18(40)	51(10)	X	X	X
IHQ	20(B)	02(F)	40 (Bf)	10 (F)	17(B,Cb,L e P)	X	55(B)	54(B)
	16(C)	36(F,BF e P)	49 (F)	41(P, Co, Bf)	39 (B)	21(Bf)	X	X
	X	46(M,C Bf)	X	X	X	15 (C)	X	X
PCR	X	X	X	X	17(P)	X	55(B)	54(B)
	16(C)	X	X	41(Co e P)	X	X	X	X
	X	46(M,R)	43 (C)	X	X	X	X	X

* Número: corresponde ao animal; X: Resultado negativo; RIFI: (N) valor do título; IMH & PCR: B=baço, Bf= Bursa de bafricius, C=cérebro, Cb= cerebelo, Co= coração, F= fígado, L=língua, M= músculo peltoral, P=pulmão, R=rim.

Pela Tabela 2 é possível observar que no 1º DAI, 3º DAI e 120º DAI, respectivamente, as codornas 16, 46 e 54 foram positivas na IMH e PCR. No 7º DAI e 14º DAI, respectivamente, as codornas 10 e 39 foram positivas na RIFI e IMH. Enquanto que no 7º DAI, 14º DAI e 30º DAI, respectivamente, as codornas 41, 17 e 55 foram positivas na RIFI, IMH e PCR. Importante observar que pelo menos um órgão de cada uma destas codornas que foi positivo pela IMH, foi também positivo na PCR

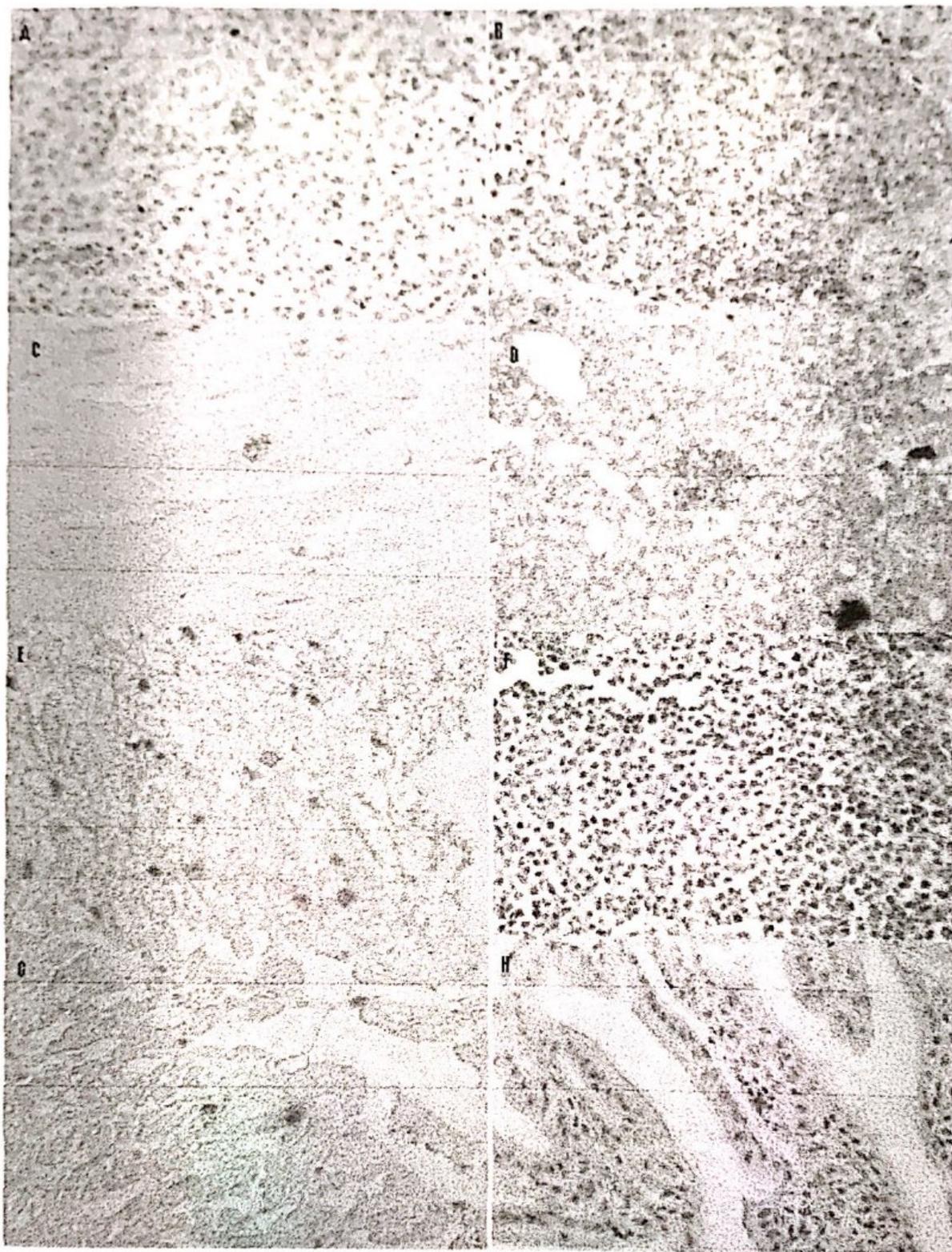


Figura 5. Imunoreatividade em órgãos de codornas infectadas experimentalmente por *N.caninum*: (A) baço, 1º DAI, (B-E) fígado, músculo peitoral, pulmão e cérebro, respectivamente de codornas do 3º DAI, (F) Bursa de fabricius, do 5º DAÍ (G) coração, 7º DAI e, (H) língua , 14º DAI, (1000 x).

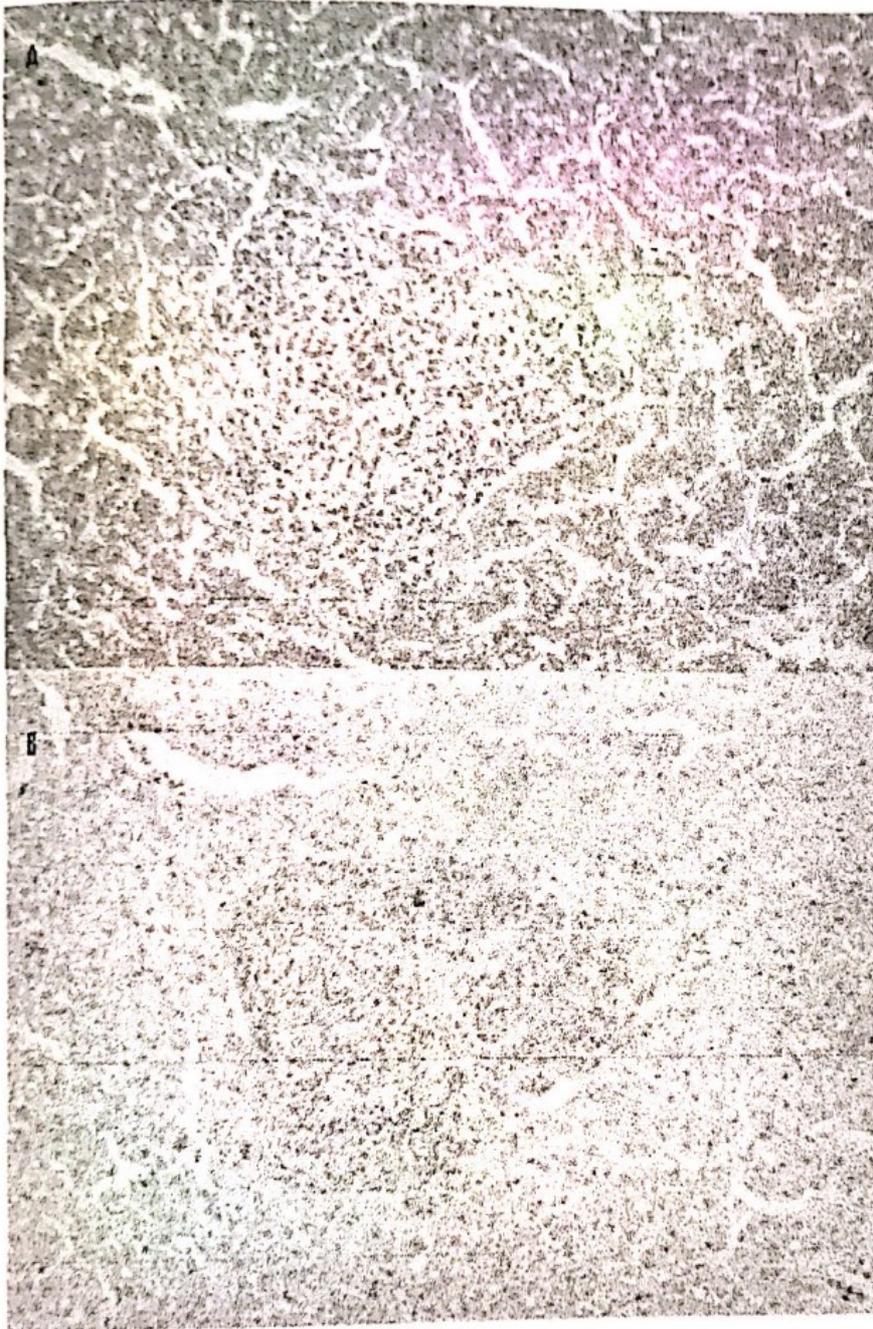


Figura 6. Achados histopatológicos em codornas infectadas experimentalmente com *Neospora caninum* A= Infiltrado infamatório mononuclear em uma codorna do 3 DAÍ (H&E), 400x; B= Infiltrado inflamatório da mesma codorna com marcações positivas (IMH), 400x.

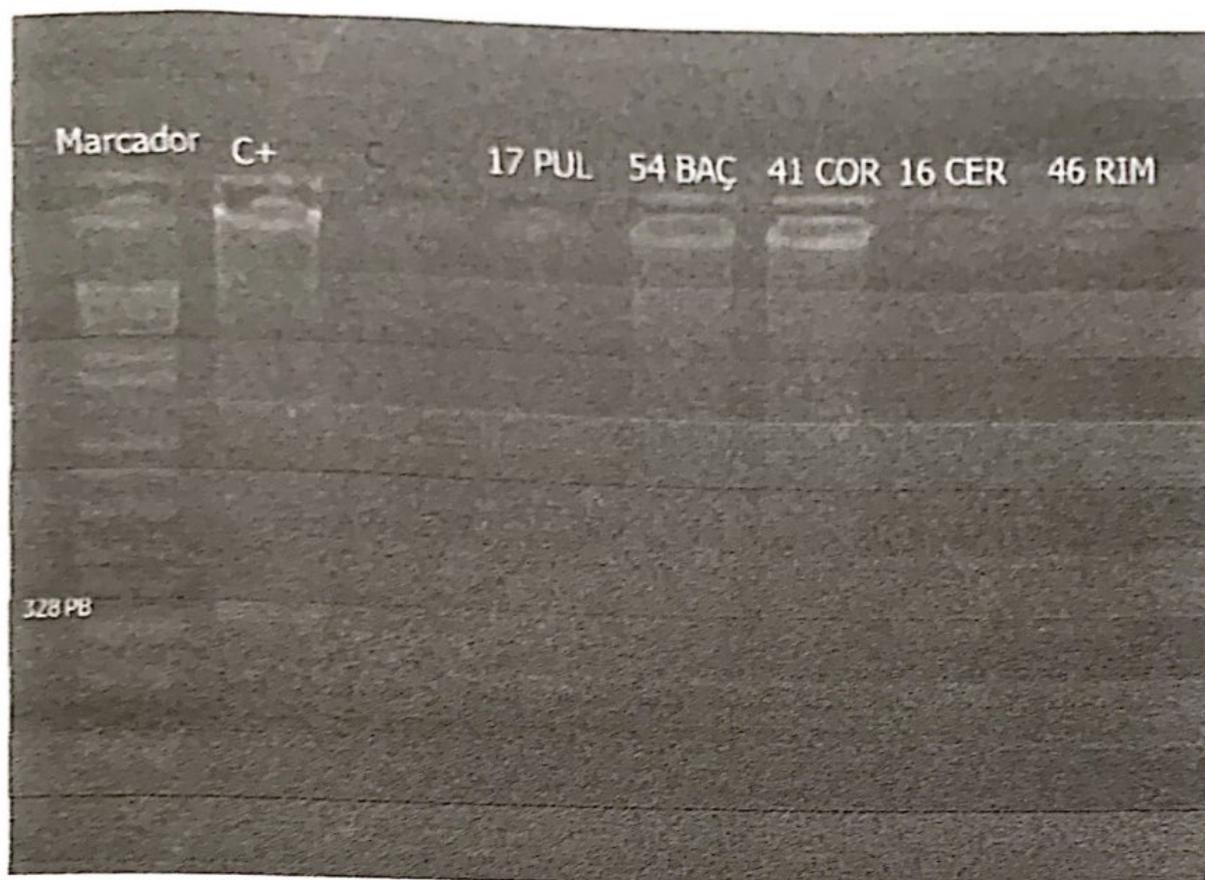


Figura 7. Detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR em amostras de tecidos de codornas experimentalmente infectadas. Canaleta 1: Marcador de peso molecular (328pb); canaleta 2: Controle positivo; Canaleta 3: Controle negativo; Canaleta 4: 17 Pulmão; 54 Baço; 41 Coração; 16 Cerebro; 46 Rim. Numero (codorna). 328 Pares de base (PB).

6. DISCUSSÃO

As codornas se mostraram resistentes a infecção pelo *N. caninum* não tendo sido observadas morbidade ou mortalidade, semelhante ao observado por Furuta et al., (2007) em frangos. No entanto, um dos pombos infectados por *N. caninum* (MINEO et al., 2009) veio a óbito no 25º DAI. O que pode demonstrar que o pombo possa ter uma maior susceptibilidade a *N. caninum*, este fato é corroborado pelo estudo de s Mcguire et al., (1999) que identificaram *N. caninum* em todos os pombos infectados..

A sorologia evidenciou uma curva de titulação que se teve a sua ascensão após o 5º DAI e se encerrou no 30º DAI, alcançando o seu pico no 14º DAI, que pode ser um indício de controle da infecção pelo hospedeiro. Outros estudos experimentais corroboram com estes achados com picos de titulação ocorrendo entre a segunda e terceira semana (FURUTA et al., 2007 e MINEO et al., 2009). Nestes trabalhos observou-se titulações superiores aos encontrados nas codornas e pode estar relacionada a via de infecção utilizada (intraperitoneal), que tende a induzir uma resposta mais intensa por parte do hospedeiro. Estes achados demonstram que apesar das aves serem possíveis portadoras (Costa et al., 2008) a identificação de infecções crônicas, através da sorologia, pode ser comprometida pela ausência da detecção de anticorpos IgG, nas diluições propostas em estudos prévios (Mineo et al., 2009), mesmo em aves reinfetadas (Furuta et al., 2007), o que sugere a utilização de pontos de corte inferiores aos recomendados. No entanto Mcguire et al. (1999) encontraram uma titulação alta em pombos na 6 semana após a infecção, com um ponto de corte superior ao deste estudo, o que pode indicar uma possibilidade da infecção permanecer por um tempo maior nessa espécie. Assim como que obteve uma prevalência de 35,8% (24/67) em corvos, com menos de um ano de idade (*Corvus corax*) (MOLINA-LÓPEZ et al. 2011), o que pode ser explicado pela baixa idade com exposição recente, associado a uma possível susceptibilidade desta espécie que pertence ao mesmo clado dos pombos (TolWeb, 2012).

O ganho de peso das codornas manteve-se semelhante entre os grupos A e B durante todo o experimento, sem diminuição em relação ao controle, mesmo durante a fase aguda da infecção, demonstrando que a infecção não foi capaz de interferir negativamente no desenvolvimento ponderal das aves. Contudo, a partir da

terceira semana de infecção observou-se um aumento gradual do peso médio dos animais infectados em relação aos animais controle, fenômeno este já descrito em codornas infectadas com *Toxoplasma gondii* (MUNHOZ, 2000). O que influencia este fenômeno deve ser objeto de novos estudos, onde na nossa hipótese relaciona uma possível a imunidade cruzada, contra outras espécies de coccídios presentes nas aves e que poderia ter um efeito positivo sobre o ganho de peso das aves.

O resultado da PCR demonstrou baixo número de aves positivas (7/48), corroborando com infecções naturais em pardais (3/40) (GONDIM et al., 2010) e em outras aves silvestres (3/201) (DARWICH et al., 2011). Contudo diverge dos estudos de McGuire et al. (1999), provavelmente em função da via de inoculação utilizada. A identificação do DNA de *N. caninum*, somente no cérebro, já havia sido relatada anteriormente (MCGUIRE et al., 1999; DARWICH et al., 2011) assim como no cérebro e coração, através de macerados de cérebro e coração (GONDIM et al., 2010).

Órgãos como o baço, coração, músculo peitoral, pulmão e rim foram positivos na PCR e IHQ, o que demonstra a possibilidade de disseminação do parasito pela via sub-cutânea. Contudo o número de órgãos positivos proporcionalmente inferior aos de outros trabalhos experimentais. Sendo que a imunoreatividade em vários órgãos, também já havido sido identificadas anteriormente (MINEO et al., 2009), assim como visualização de um cisto pela IMH na musculatura (MINEO et al., 2011), demonstrando que a distribuição de *N. caninum* pode atingir vários órgãos das aves, não tendo como afirmar se há uma predileção, pois a quantidade de órgãos atingidos foi baixa.

Esperava-se pela concentração do inoculo, que um grande número de aves e seus respectivos tecidos tivessem sido detectados como positivos com as técnicas utilizadas, contudo este fenômeno não ocorreu, por ex. a codorna que atingiu a maior titulação na RIFI (1:320) não teve tecidos positivos tanto na PCR quanto na IMH. Da mesma forma que alguns órgãos que foram positivos para uma técnica, acabaram negativos em outra. É provável que uma baixa concentração de parasitos ou uma distribuição irregular sejam os responsáveis por este resultado, o que pode indicar o uso do Nested PCR ou PCR em tempo real para minimizar a chance de resultados falso-negativos, tanto em infecções naturais, quanto experimentais.

Além disso, uma baixa concentração de parasitos nos tecidos evidencia uma resistência destas aves à infecção, pois apesar de ser ofertado uma quantidade de

tecidos das codornas, semelhante aos de outros estudos (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; FURUTA et al., 2007; KING et al., 2010) nenhum cão eliminou oocistos ou soroconverteu, o que reforça a hipótese de ausência de cistos nos tecidos ofertados. Até o momento apenas Furuta et al. (2007), obtiveram êxito na produção de oocistos por cães alimentados com ovos embrionados, onde é provável que esta produção possa estar relacionada a alta carga parasitária presente na membrana córion-alantóide ofertadas. .

As codornas pertencem ao Clado: *Gallonaseræ*, Ordem: Galliformes, Família: *Phasianidae* e Genero: *Coturnix*. Enquanto que os pombos (considerados bons modelos experimentais por Mineo et al. (1999) pertencem ao Clado: *Neoaves*, Ordem: *Columbiformes*, Família: *Columbidae* Gênero: *Columba* (Tolweb, 2012). No entanto por terem essas aves percorridos caminhos diferentes no decorrer de sua evolução, pode ter ocorrido em algum momento essa diferença na susceptibilidade a *N.caninum*. Já que em algumas espécies e ordens que já passaram por investigações não foi possível encontrar indícios que comprovassem a exposição da ave a *N. caninum* (MCGUIRE et al., 1999; DARWICH et al., 2011; Mineo et al., 2011). E dessa forma lançando um questionamento sobre o potencial das aves para serem possíveis hospedeiros intermediários, e ao mesmo tempo colocando dúvidas se a ordem das aves poderia possuir graus de susceptibilidade diferentes frente ao parasito (MCGUIRE et al., 1999), como ocorre com os mamíferos.

No entanto ainda e necessário ter muita cautela para se afirmar se alguma destas aves possa de certa forma ter adquirido resistência a *N. caninum*, pois existem fatores como número de animais utilizados de cada espécie, técnica utilizada, idade, grau de exposição e ambiente que de certa forma acabam influenciando na resposta do parasito ao hospedeiro.

7.CONCLUSÃO

Não possível associar diretamente as lesões histopatológicas a presença do *N.caninum*. No entanto, infiltrados inflamatórios no fígado de cordas do 3 ao 7 DAI com imunoreatividade a IHM.

Foram observados produção de anticorpos fugazes nas codornas infectadas experimentalmente.

Cães quando alimentados com tecido de codornas experimentalmente infectados com *N.caninum* não soroconverteram e tampouco eliminaram oocistos do parasita.

Com base nos resultados deste trabalho as codornas não se mostraram um bom modelo biológico para a manutenção do *N. caninum* devido ao baixo número de órgãos e codornas identificadas como positivas, bem como se mostraram resistentes a infecção com taquizoítos de *N.caninum* nas condições deste trabalho.

8. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo financiamento do projeto; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e ao professor Dr. Luis Fernando Pita Gondim da Universidade Federal da Bahia, pelo fornecimento dos controles para PCR e RIFI.

9. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 60-61, p. 417-431, 2000.
- BAKER, D. G.; MORISHITA, T. Y.; BROOKS, D. L.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 783-785, 1995.
- BARBER, J.S.; HOLMDHL, O.J.M.; OWEN, M.R.; GUY, F.; UGGLA, A.; TRESS, A.J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.111, n. 5, p. 563-568, 1995.
- BARRAT, J.; AL QASSAB, S.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 4, p. 228-233, 2008.
- BARTELS, C. J. M.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 247-257, 1999.
- BARR, B. C.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; BONDURANT, R. H.; ARDANS, A. A.; OLIVER, M. N.; CONRAD, P. A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal Veterinary of Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 2, p. 207-215, 1994.
- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd.** v. 70, n. 2, p.271-274, 1984.
- BJERKÅS, I.; PRESTHUS, J. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 445-54, 1988.
- BJERKAS, I.; DUBEY, J. P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinary Scandinavia**, v. 32, n. 3, p. 445-447, 1991.
- BUXTON, D.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; THOMSON, K. M.; RAE, A. G.; INNES, E. A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, n. 4, p. 267-279, 1998.
- BUXTON, D; MCALLISTER, M. M; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.18, n.12, p.546-552, 2002.
- CAVALCANTE, G. T.; MONTEIRO, R. M.; SOARES, R. M.; NISHI, S.M.; ALVES NESTO, A.F.; ESMERINI, P.O.; SERCUNDES, .M.K.; MARTINS, J.; GENNARI, S.M.

Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v.179 ,n.1-3 , p.220-223, 2011.

COSTA, K. S.; SANTOS, S.L.; UZEDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A.; ARAUJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.2, p.157-159, 2008.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ARNÁIZ-SECO, I.; MORENO BURGOS, B.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; ADURIZ, G.; FERNÁNDEZ-GARCIA, A.; ORTEGA-MORA, L.M. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**, v.142, n.1-2, p.187-191, 2006.

DARWICH, L.; CABEZÓN, O.; ECHEVERRIA, I.; PABÓN, M.; MARCO, I.; MOLINA-LÓPEZ, R.; ALARCIA-ALEJOS, O.; LÓPEZ-GATIUS, F.; LAVÍN, S.; ALMERÍA, S. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the Brain of Wild birds. **Veterinary Parasitology**.183,n.3-4, p. 377-81, 2011.

DIJKSTRA, T; EYSKER, M; SHARES, G; CONRANTHS, F.J; WOUDA, W; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747-752, 2001.

DIJKSTRA, Th; BARKEMA, H. W.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 89-98, 2002.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-85, 1988a.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J. P.; KOESTNER, A.; PIPER, R. C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 7, p. 857-860, 1990.

DUBEY, J. P; DE LAHUNTA, A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. **Applied Parasitology** v. 34, n. 4, p. 229-233, 1993.

DUBEY, J. P; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2 p. 1-59, 1996.

- DUBEY J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3-4, p. 349-367, 1999a.
- DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 8, p. 1160-1163, p. 1999b.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.929-946, 2002.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, L.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, S.; CHOUDHARY. Gray Wolf (*Canis lupus*) is natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, 2011
- FAYER, R. Epidemiology of Protozoan infections: The Coccidia. **Veterinary Parasitology**, v. 6, n. 1-3, p. 75-103, 1980.
- FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 346-349, 2007.
- FURUTA, P. I.; MINEO, T. W. P.; CARRASCO, G. S.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v. 134, n. 14, p. 1931-1939, 2007.
- GONÇALVES, I. N. **Investigação sorológica, molecular e isolamento de coccídios toxoplasmatíneos em galinhas (*Gallus domesticus*)**. Dissertação (mestrado), Pós Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia, 2010.
- GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESUS, E. E. V.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDEZ, H. S.; ALMEIDA, M. A. O.; FREIRE S. M.; MEYER, R.; MCALLISTER M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p.1-7, 2001.
- GONDIM, L. F.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.
- GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-61, 2004.

GONDIM, L. S.; ABE-SANDES, K.; UZEDA, R. S.; SILVA, M. S.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M.; GONDIM, L. F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1-2, p. 121-124, 2010.

GUIMARÃES, E. B.; VASCONCELOS, A.C.; MARTINS, N.R.S.; OLIVEIRA, R.F.M.; MORO, L.; NUNES, J.E.S.; SANTOS, F.G.A. Porcentagem de parênquima e índice apoptótico da bolsa cloacal em frangos de corte em ambiente de conforto e estresse térmico. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.2, p. 178-186, 2003.

HAY, W.H.; SHELL, L.G.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 1, p. 87-89, 1990.

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

ICHILCIK, R.; AUSTIN, J. C. The japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) as a laboratory animal. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 49, n xx, 203-207, 1978.

KING, J. S.; ŠLAPETA, J; JENKINS, D. J; AL-QASSAB, S. E; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. V. 40, n.8, p. 945-50, 2010.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 11, p.1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S; DUBEY, J. P; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 327-333, 1999.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2000.

LUNDEN, A.; MARKS, J.; MALEY, S.; INNES, E. A. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 11, p. 519-526, 1998.

MANSOURIAN, M.; KHODAKARAM-TAFTI, A.; NAVAMARI, M. Histopathological and clinical investigations in *Neospora caninum* experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. **Veterinary Parasitology**, v 166, n.3-4, p. 185-190, 2009.

MARKS, J.; LUNDEN, A.; HARKINS, D.; INNES, E. A. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T-cells and immune sera from experimentally infected cattle. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 7, p. 303-309, 1998.

MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum*

in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 349-351, 2011.

McALLISTER, M. M.; HUFFMAN, E. M.; HIETALA, S. K.; CONRAD, P. A. ANDERSON, M. L.; SALMAN, M. O. Evidence suggesting a point source exposure in na outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 3, p. 355-35, 1996.

McALLISTER, M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D.; JOLLEY, W.; WILLS, R.; McGUIRE, A.; Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, M. M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGER, D. Evidence of a point source outbreak to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 6, p. 881-887, 2000.

MCGUIRE, A. M.; McALLISTER, M.; WILLS, R. A.; TRANAS, J. D. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1525-1529, 1999.

MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; MARCIANO, J. A.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology**, v.159, n.2, 149-153, 2009.

MINEO, T. W. P.; CARRASCO, A. O. T.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v.182, n. 2-4, p.352-355, 2011.

MOLINA-LÓPEZ, R.; CABEZON, O.; PABON, M.; DARWICH, L.; OBON, E.; LOPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J. P.; ALMERIA, S. High Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the common raven (*corvus corax*) in the Northeast of Spain. *In press*, 2011.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1545-1556, 1999.

MUNHOZ, A. D. Resposta clínica e hematológica de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) inoculadas experimentalmente com taquizoítas do *Toxoplasma gondii* nicolle & manceaux, 1909 (Apicomplexa: toxoplasmatinae). Dissertação de Mestrado. Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 80f, 2000.

NAVAMARI, M.; MANSOURIAN, M.; TAFTI, A. K.; HOSSEINI, M. H.; RAHIMIYAN, A.; KHORDADMEHR, M.; LOTFI, M. Application of chicken embryonated eggs as new

model for evaluating the virulence of *Neospora caninum* tachyzoites. **Comparative Clinical Pathology**, publication online, 2011.

OULD-AMROUCHE A.; KLEIN F.; OCSDOIT C.; MOHAMMED H.O.; TOURATIER A.; SANAA M.; MIALOT J.P. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from normandy, France. **Veterinary Research**, v.30, n.5, 531-538, 1999.

OTRANTO, D.; LLAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; FRANGIPANE DI REGALBONO, A.; BADAN, M.; CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.1-2, p.7-18, 2003.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.

PINTO, R.; FERREIRA, A. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; VARGAS, J. G. J. Níveis de Proteína e Energia para Codomas Japonesas em Postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1761-1770, 2002.

REIS, L.F.S.D. Codornizes, criação e exploração. **Lisboa: Agros**, 10, 1980. 222p.

SARTOR, I. F.; GARCIA FILHO, A.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; DAL PAI, V.; SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de presidente prudente, São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.4, p.413-418, 2005. p. 321-327, 1999.

SILVA, M. S.; UZEDA, R. S.; COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; MACEDO, A. C.; ABESANDES, K.; GONDIM, L. F. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidian (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 156-159, 2009.

SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; FOURNET, V. M.; ROSENTHAL, B. M.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Detection of *Hammondia heydorni*-like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p.1082-1085, 2003.

SCHARES, G.; RAUSER, M.; PETERS, M.; ZIMMER, K.; PETERS, M.; WURM, R.; DUBEY, J. P.; de GRAAF, D. C.; EDELHOFER, R.; MERTENS, C.; HESS, G.; CONRATHS, F. J. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 4, p. 688-694, 1999.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEM, P.; RAUSER, M.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum* – associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 293-305, 2002.

SICUPIRA, P. M. I.; MAGALHÃES, V. S. C.; GALVÃO, G. S.; PEREIRA, M. J. S.; GONDIM, L. F. P.; MUNHOZ, A. D. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 305-308, 2012.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.1, n.3, p.205-209, 1989.

Toweb. Neonirthes. Modern birds, disponível em <http://tolweb.org/Neornithes/15834>, acesso em 9 de maio de 2012.

UGGLA, A.; DUBEY, J. P.; LUNDMARK, G.; OLSON, P. Encephalomyelitis and myositis in a boxer puppy due to a *Neospora*-like infection. **Veterinary Parasitology**, v. 32, n. 2-3, p. 255-260, 1989.

THURMOND, M. C.; HIETALLA, S. K. Effect of congenitally-acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 12, p.1381-1385, 1997.

VOGEL, F. S. F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1948-1951, 2006.

WILLIAMS, C. S. F. Quail. In: **Practical Guide Laboratory Animals**. 1ª ed., Ed. MOSBY, 207p. 1976.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; VISSER, U.; VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 2, p.180-185, 1997.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows that experienced a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v. 49, n. 7, p. 1311-1316, 1998.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; SHIBARA, T.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K.; CONRAD, P.A. In vitro isolation and characterisation of a bovine *Neospora* species in Japan. **Research Veterinary Science**, v.63, n.1, p. 77-80, 1997.

10. ANEXOS

ANEXO 10.1. EXTRAÇÃO DE DNA DO TECIDOS DAS CODORNAS

1. Foram adicionados 350 μ L da solução A em cada amostra para suspender as células do tecido, para então serem vortexizadas para homogenização destas células.
2. Logo em seguida as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos em banho Maria (thermo BATH ALB64 (FINEPCR)).
3. Retirando as amostras do banho Maria foram adicionado 150 μ L da solução B para então serem vortexizadas mais uma vez.
4. Sendo em seguida acrescido 500 μ L de clorofórmio e então vortexizado novamente, até que a mistura adquirisse uma forma homogênea.
5. Para então serem centrifugadas a 4°C por 10 minutos a velocidade máxima para a separação das fases.
6. A fase superior do tubo foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga.
7. Para a precipitação do DNA, foi adicionado na amostra 1mL de álcool etílico 100% (-20°C) e então vortexizadas brevemente.
8. Logo em seguida foram incubadas a -20°C durante 30 minutos. Ao retirar as amostras do freezer, estas foram centrifugadas a velocidade máxima a 4°C por 10 minutos.
9. O Álcool etílico 100% foi removido e então foi adicionado 500 μ L de álcool etílico 80% (-20°C), sendo misturadas através de inversão do tubo em 5 tempos.
10. Então foram centrifugadas a velocidade máxima (4°C) por 5 minutos. Salvando o pellet e removendo o álcool etílico 80% de forma cuidadosa.
11. As amostras foram novamente centrifugadas (4°C) por 3 minutos e o resíduo do álcool etílico foi removido e os tubos ficaram abertos por 5 minutos para a evaporação do álcool.
12. O pellet dos tubos foi então suspensos através de 100 μ L de TE buffer.
13. Então foi adicionado 2 μ L de RNase em cada amostra.
14. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos em banho Maria (Thermo BATH ALB64 (FINEPCR)).

15. E logo em seguida as amostras foram estocadas a -20°C até o momento de suas quantificações e PCRs.

ANEXO 10.2. EXTRAÇÃO DO DNA DAS FEZES DOS CÃES QUE INGERIRAM TECIDO DE CODORNAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS POR NEOSPORA CANINUM

1. Foi pipetado 200 μ L de cada amostra em um tubo de microcentrífuga de 2 mL.
2. Sendo Adicionado em seguida 1,4ml do Tampão ASL para cada amostra de fezes.
3. Foram Misturadas continuamente no Vortex por 1 minuto ou até que a amostra de fezes fossem completamente homogeneizadas.
4. Aqueceu-se a suspensão por cinco minutos a 70°C e Homogenizou no Vortex por 15 segundos a amostra e em seguida centrifugou-se em velocidade máxima durante 1 minuto para formação do pellet.
5. Pipetou-se 1,2 mL do sobrenadante para um tubo de 2mL da microcentrífuga novo e descartou o Pellet.
6. Adicionou-se 1 Tablete de InhibitEX para cada amostra e homogenizou no Vortex imediatamente e continuamente por 1 minuto ou até que o Tablete seja totalmente suspenso.
7. Incubou-se as suspensões por 1 minuto em temperatura ambiente para permitir que os inibidores matriz inhibitex seja absorvidos.
8. Centrifugou-se as amostras a toda velocidade por 3 minutos para que os pellets dos inibidores fossem ligados a inhibitex matriz.
9. Pipetando em seguida todo o sobrenadante para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL e descartando o pellet.
10. Centrifugando novamente as amostras a toda velocidade por 3 minutos. Para então Pipetar 15 μ L da proteinase K em um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e logo em seguida acrescentar mais 200 μ L do sobrenadante da etapa anterior para dentro deste tubo, e completando com 200 μ L de tampão AL.
11. Sendo posteriormente homogeneizadas no Vortex por 15 segundos e logo em seguida incubadas a 70°C por 10 minutos.
12. Para que então fosse adicionado 200 μ L álcool absoluto para o lisado e misturados em um vortex.
13. As tampas de uma nova coluna rodada do QIAamp foram Etiquetadas e colocadas em um tubo de coleta de 2 mL.

14. O lisado completo foi cuidadosamente aplicado para a coluna despin QIAamp sem umedecimento aro.
15. As tampas foram fechadas e centrifugadas a toda velocidade durante 1 minuto. O material centrifugado foi Colocado em um novo tubo de 2mL.
16. A coluna QIAamp girada foi aberta e adicionou-se 500 μ L da solução tampão AW1.
17. A tampa então foi fechada e centrifugada a toda velocidade por 1 minuto.
18. Colocando em seguida a coluna QIAamp rodada em um novo tubo de 2 mL , para em seguida a coluna rodada do QIAamp ser aberta e adicionado 500 μ L de solução tampão AW2.
19. A tampa foi fechada e centrifugada mais uma vez, a toda a velocidade por 3 minutos e descartar o tubo de coleta contendo o filtrado.
20. Sendo então Transferida a coluna rodada QIAamp para um novo tubo de microcentrífuga e etiquetado.
21. A coluna rodada QIAamp foi aberta e então pipetados 200 μ L da solução tampão AE diretamente sobre a membrana do QIAamp, Fechando a tampa e incubando-a por 1 minuto à temperatura ambiente, para em seguida, mais uma vez fosse centrifugada a velocidade máxima durante 1 minuto para finalmente eluir o DNA.

ANEXO 10.3 REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

1. Cortes dos tecidos incluídos em parafina foram incubadas na estufa por 60 minutos para o processo de desparafinização.
2. Em seguida os tecidos passaram por um processo de hidratação seguindo a seguinte ordem dos alcoóis: álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, álcool 95 I, álcool 95 II, álcool 85 I e álcool 85 II, passando por 15 segundos em cada etapa.
3. Sendo posteriormente embebidas em dois banhos de xilol, com 10 minutos em cada um, para o processo de clareamento com a evaporação da parafina.
4. As lâminas receberam 10 lavagens em água destilada e foram incubadas em tampão citrato pH 7,0 em banho-maria com a temperatura de 96°C por 30 minutos.
5. Após esse período, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos em temperatura ambiente. recebendo posteriormente 5 lavagens de água destilada, sendo imersas por 5 minutos sob uma solução de Tris-HCl (pH 7,2).
6. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado uma solução de peróxido de hidrogênio à 8% em e álcool metílico.
7. Em seguida as lâminas passaram por mais 5 lavagens em água destilada e 5 minutos na solução de Tris-HCl (pH 7,2) e foram postas em câmara úmida, sendo feito o bloqueio de proteínas inespecíficas e biotina endógena com o leite desnatado à 4% por 20 minutos.
8. As lâminas receberam 5 lavagens com água destilada seguido de mais 5 lavagens com o TRIS-HCl (pH 7,2) para que então pudesse ser adicionado 100 µL de anticorpo policlonal primário de *Neospora caninum*, na diluição de 1:6000. Para que então fossem deixadas refrigeradas em *over night*.
9. No dia seguinte após nova lavagem com Tris-HCl (pH 7,2) foi utilizado como anticorpo secundário o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (LSAB), utilizando-se kit DakoCytomation™ Dinamarca conforme especificações do fabricante.
10. Posteriormente foi adicionado 100 µL do cromógeno tetrahidrocloro de diaminobenidina (DAB) (DakoCytomation™, Dinamarca).
11. Como contracorante foi utilizado a Hematoxilina de Harris.

12. Em seguida as lâminas com os tecidos passaram por um processo de desidratação: álcool 80 II, álcool 80 I, álcool 95 II, álcool 95 I, álcool absoluto III, álcool absoluto II e o álcool absoluto I
13. para que então fossem imersas no xilol e então as lâminas pudessem ser montadas com as lamínulas com o auxílio do Entelan.

ANEXO 10.4. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DOS CÃES E DAS CODORNAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR NEOSPORA CANINUM

1. Cada soro foi diluído em PBS pH 7,2. Em cada poço adicionou-se 10µL de soro diluído.
2. O material foi incubado a 37°C por 30 minutos, submetendo-os depois a duas lavagens, com PBS por 5 minutos sob leve agitação.
3. Após secagem, foram adicionado 10µL de conjugado anti-IgG canino (Sigma®-Aldrich F4012 inc., USA) e diluídos conforme especificação do fabricante, adicionando-se 0,5% de azul de Evans à solução.
4. As lâminas foram incubadas em câmara úmida e escura a 37°C por 30 minutos e lavadas posteriormente como descrito anteriormente, porém com a cuba coberta ou envolta com papel alumínio para evitar propagação da luz.
5. Após a lavagem das lâminas em PBS, as mesmas foram secas a temperatura ambiente ou em estufa por cinco minutos e em seguida realizou-se a montagem das lâminas com lamínula e glicerina tamponada (90% de glicerol e 10% PBS).

OBS: Na padronização da RIFI em aves, No passo 2 o material foi incubado por 1 hora ao invés de 30 minutos. E no passo 4 por 45 minutos ao invés de 30 minutos.