



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**Alterações provocadas por *Neospora caninum* e imunodeteccção de  
*Toxoplasma gondii* em placentas de cabras sem raça definida**

Emanuela Polimeni de Mesquita

Recife, 2018.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**Alterações provocadas por *Neospora caninum* e imunodeteção de  
*Toxoplasma gondii* em placentas de cabras sem raça definida**

Emanuela Polimeni de Mesquita

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

**Orientadora:** Marleyne José Afonso Accioly  
Lins Amorim

**Co-orientador:** Rinaldo Aparecido Mota

Recife, 2018.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M582a Mesquita, Emanuela Polimeni de  
Alterações provocadas por *Neospora caninum* e imunodeteção  
de *Toxoplasma gondii* em placentas de cabras sem raça definida /  
Emanuela Polimeni de Mesquita. – 2018.  
87 f. : il.

Orientadora: Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim.

Coorientador: Rinaldo Aparecido Mota.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife,  
BR-PE, 2018.

Inclui referências e anexo(s).

1. Protozoários 2. Abortos 3. Placentomas 4. Cabras I. Amorim,  
Marleyne José Afonso Accioly Lins, orient. II. Mota, Rinaldo  
Aparecido, coorient. III. Título

CDD 636.089

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

---

**Emanuela Polimeni de Mesquita**

Aprovada em, 27/02/2018.

Banca examinadora:

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim - Orientadora**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - DMFA/UFRPE

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ademar Afonso de Amorim Júnior**  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Áurea Wischral**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - DMV/UFRPE

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Valdemiro Amaro da Silva Júnior**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - DMV/UFRPE

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Júlio Cezar dos Santos Nascimento**  
Centro Universitário Maurício de Nassau

## **Dedicatória**

Aos meus avós Roque de Mesquita  
(in memorian), Fernando de Mesquita (in  
memorian), Maria da Penha de Mesquita (in  
memorian) e Vanilda de Mesquita.

*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”.*

*Mahatma Gandhi*

## Agradecimentos

À Deus, primeiramente por ter nos dado o dom da vida e do livre arbítrio.

Aos animais utilizados na experimentação o meu eterno respeito e agradecimento pelo aprendizado proporcionado.

Aos meus pais, Victor Mesquita, Sarajane Mesquita e minha irmã Paula Mesquita, minha base sólida em todos os momentos.

À Everton Cavalcante, pelo companheirismo e compreensão nos momentos de ausência.

À prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim, pela confiança e pela oportunidade de continuar trabalhando em seu grupo de pesquisa desde a graduação.

Ao prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Rinaldo Aparecido Mota, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e por todo aprendizado em todo o período do doutorado.

À Pomy Kim, Jonatas Campos, Júnior Mário Baltazar e Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Wagner Porto, pelo auxílio durante todo o período das coletas.

Às minhas grandes amigas Grasiene Meneses e Sandra Torres, pelo companheirismo e auxílio durante o processamento e análises dos materiais dos trabalhos.

Aos professores Dr<sup>º</sup>. Valdemiro Amaro da Silva Júnior e Dr<sup>ª</sup>. Andrea Alice da Fonseca Oliveira, pelos ensinamentos e acompanhamento durante o processo de análises das amostras.

Ao Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Pabyton Cadena, Prof<sup>º</sup>. Dr. Luiz Carlos Alves, Rafael Padilha, Jana Sandes, bem como, toda a coordenação do LIKA-UFPE (Laboratório de imunopatologia Keizo Asami) por viabilizarem o processamento das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão.

A Gabriela Vascondelos, Josiane Honório e aos demais colegas pela ajuda durante as observações no CETENE.

Aos amigos do LDIC/DMV-UFRPE (Laboratório de doenças infectocontagiosas), pelo apoio.

Aos amigos do Laboratório de Patologia animal/DMV-UFRPE, pelo apoio.

Aos meus colegas do Laboratório de Anatomia e patologia animal/UAG pelo companheirismo e compreensão durante o último ano de realização das experimentações.

À CAPES, pelo auxílio financeiro de bolsa durante parte dessa trajetória.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência animal tropical, representado pelos Coordenadores Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Anísio Soares e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Bianchi.

À Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Unidade acadêmica de Viçosa pelo uso da estrutura da Unidade durante o desenvolvimento do experimento.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, que me acolheu desde a graduação.

**Muito obrigada!**



## **Fontes Financiadoras**

Apoio e financiamentos através de bolsa, Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES).

## SUMÁRIO

1. LISTA DE FIGURAS .....	12
2. LISTA DE TABELAS .....	13
3. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES .....	14
4. LISTA DE ANEXOS .....	16
5. RESUMO .....	17
6. ABSTRACT .....	18
7. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA .....	19
8. REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Placentação em ruminantes .....	22
2.2 Descrição histológica na placenta .....	23
2.3 Toxoplasmose.....	26
2.4 Neosporose.....	27
2.5 Lesões placentárias causadas por protozoários .....	30
2.6 Métodos diagnósticos para infecções causadas por <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i> .....	31
2.6.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR) .....	32
2.6.2 Histopatologia .....	33
2.6.3 Testes sorológicos .....	33
2.6.4 Imunohistoquímica .....	34
2.6.5 Microscopia eletrônica de transmissão .....	35
3. OBJETIVO .....	38
3.1 Geral .....	38
3.2 Específicos .....	38
4. ARTIGOS .....	39
4.1 Artigo 1: Imunodeteccção de <i>Toxoplasma gondii</i> em tecido placentário de cabras naturalmente infectadas .....	39
4.2 Artigo 2: Ultraestrutura de placenta em cabras sem raça definida infectadas experimentalmente por <i>Neospora caninum</i> .....	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64

6. REFERÊNCIAS .....	65
ANEXOS	

## LISTA DE FIGURAS

<b>Revisão de literatura</b>	
<b>Figura 1</b> Ciclo biológico de <i>N. caninum</i> .	27
<b>Figura 2</b> Ciclo biológico da toxoplasmose.	29
<b>Figura 3</b> Taquizoíto de <i>T. gondii</i> observado em MET	36
<b>Artigo 1</b>	
<b>Figura 1</b> Placentas de cabras naturalmente infectadas por <i>T. gondii</i> analisadas na imunohistoquímica.	44
<b>Artigo 2</b>	
<b>Figura 1</b> Eletromicrografia de placentas de cabras do grupo controle em diferentes idades gestacionais.	56
<b>Figura 2</b> Eletromicrografia de placentas de cabras dos grupos infectados por <i>N. caninum</i> .	58
<b>Figura 3</b> Eletromicrografia de placenta de cabra de GI infectada experimentalmente por <i>N. caninum</i> .	59

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

**Tabela 1** Resultados das técnicas de ELISA, análise histopatológica e imunohistoquímica e suas respectivas frequências absoluta e relativa 43

**Tabela 2** Classificação das células imunorreativas em IHQ para *T. gondii* 45

### Artigo 2

**Tabela 1** Análise macroscópica da placenta de cabras dos grupos experimentais inoculados com *N. caninum* e controle respectivos: número de placentomas, peso e tamanho de acordo com a proximidade do funículo umbilical (CPC) ou distância (CLC) 54

**Tabela 2** Comparação dos grupos experimentais inoculados com *N. caninum* e controle de placentomas de cabras quanto ao número, peso e proximidade do funículo umbilical 55

**Tabela 3** Lesões celulares encontradas em fibroblastos de placenta de cabras infectadas experimentalmente com *N. caninum* 57

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES

ATP	Adenosina trifosfato
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
cm	Centímetros
CNPq	Conselho Nacional de pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
Dg	Grânulos densos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay (Imunoadsorção enzimática)
G1	Grupo experimental 1
G2	Grupo experimental 2
G3	Grupo experimental 3
G4	Grupo controle
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IHQ	Imunohistoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4

LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MAT	Teste de aglutinação modificado
mL	Militros
Mn	Micronema
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
<i>N. caninum</i>	<i>Neospora caninum</i>
NcGRA 1, 2 e 7	Marcadores para expressão de antígenos de grânulos densos
nm	Nanômetros
Nuc	Núcleo celular
PAS	Ácido periódico de Shiff
PCR	Reação em cadeia de polimerase
®	Marca registrada
RER	Retículo endoplasmático rugoso
Rho	Roptrias
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF- $\alpha$	Interferon alfa

## **LISTA DE ANEXOS**

### **Licenças para execução do experimento pela CEUA**

Licença nº 122/2015 – CEUA/UFRPE

Licença nº 059/2013 – CEUA/UFAL

Licença nº 137/2014 – CEUA/UFRPE

Licença nº 119/2016 – CEUA/UFRPE

### **Normas das revistas (Instruções dos autores)**

**Artigo 1** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

**Artigo 2** Pesquisa Veterinária Brasileira



## RESUMO

O *Toxoplasma gondii* e o *Neospora caninum* são protozoários que causam diversas desordens reprodutivas em animais. Este estudo foi realizado com objetivo em cabras, os danos placentários causados por esses protozoários durante a gestação. No primeiro experimento foi realizada, análise ultraestrutural em placentas de animais infectados experimentalmente por *N. caninum*. Os animais foram divididos em 4 grupos, e inoculados em diferentes tempos gestacionais: G1, com inoculação aos 40 dias de gestação (n=4); G2, animais inoculados aos 90 dias de gestação (n=4); G3, inoculados aos 120 dias de gestação (n=4) e G4, grupo controle (n=3). Quando observado sofrimento fetal, as cabras foram eutanasiadas para coleta dos placentomas. Estes foram fixados em glutaraldeído com tampão fosfato a 2,5% refrigerado. As amostras foram pós-fixadas, desidratadas e incluídas em Époxy e, posteriormente realizados cortes em ultramicrótomo e analisadas. Foram identificadas lesões celulares graves como degenerações, vacuolização celular, retração nuclear/degeneração nuclear, restos celulares, em uma das amostras, o protozoário foi visualizado. Em conclusão, os achados ultraestruturais apresentados indicam modificações celulares degenerativas acentuadas em placentas de cabras induzidas por *N. caninum*. No segundo experimento, utilizou-se placentas provenientes de animais naturalmente infectados por *T. gondii*. Foram avaliadas 213 amostras de placenta de animais sorologicamente positivos em ELISA, submetidos a exames histopatológicos. Apenas 23 amostras apresentaram lesões características para protozoários e 4 foram provenientes de animais sorologicamente negativos, porém que também apresentaram as mesmas lesões. As amostras placentárias passaram por processo de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os cortes de placentas foram submetidos a imunohistoquímica (IHQ) utilizando anticorpo anti-*Toxoplasma gondii* e o kit comercial DAKO LSAB2 System-HRP. Dessas amostras de placenta obtidas, 85,2% (23/27) foram positivas na IHQ e 81,5% (22/27) apresentaram lesões compatíveis com a infecção por *T. gondii*. A imunoexpressão ocorreu em células epiteliais das vilosidades placentárias. A técnica de IHQ demonstrou ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico de *T. gondii* em tecido placentário de cabras naturalmente infectadas complementando de forma decisiva e agregando maior valor aos resultados obtidos na análise histopatológica e sorológica.

**Palavras-chave:** Protozoários, abortos, placentomas, cabras.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* are protozoa that cause various reproductive disorders in animals. With the objective of studying the reproductive disorders in goats, aiming at the placental damages caused by these protozoa, this study was carried out. The study consists of two stages, the first, ultrastructural analysis in placentas of 15 animals infected experimentally by *N. caninum*. The animals were divided into 4 groups, and inoculated at different gestational times: G1, with inoculation at 40 days of gestation (n = 4); G2, animals inoculated at 90 days of gestation (n = 4); G3, inoculated at 120 days of gestation (n = 4) and G4, control group (n = 3). When fetal distress was observed, the goats were euthanized to collect the placentomas. These were fixed in glutaraldehyde with 2.5% refrigerated phosphate buffer. The samples were sent to the Keizo Asami Immunopathology Laboratory for post-fixation, dehydration and inclusion in Epoxy and later to the Center of Strategic Technologies of the Northeast, where cuts were made in ultramicrotome and observation. Serious cell lesions such as degeneration, cell vacuolization, nuclear retraction / nuclear degeneration, cellular debris were identified in one of the samples, the protozoan was visualized and organelle degradation of placental cells. In conclusion, the ultrastructural findings presented indicate marked degenerative cell changes in *N. caninum*-induced goat placentas. In the second, immunohistochemistry was used in placentas from animals naturally infected with *T. gondii*. 213 placenta samples from serologically positive animals in ELISA, and also submitted to histopathological exams. Of these, 23 samples had characteristic lesions for protozoa and 4 were from serologically negative animals, but also had the same lesions. The placental samples underwent cleavage, dehydration, diaphanization and paraffin inclusion. Block cuts were performed by immunohistochemistry using anti-*Toxoplasma gondii* antibody and the commercial DAKO LSAB2 System-HRP kit. Of these placenta samples obtained, 85.2% (23/27) were positive in IHC and 81.5% (22/27) had lesions compatible with *T. gondii* infection. Immunoexpression occurred in epithelial cells of the placental villi. The IHQ technique proved to be a valuable tool in the diagnosis of *T. gondii* in placental tissue of naturally infected goats complementing in a decisive way and adding greater value to the results obtained in the histopathological and serological analysis

**Key words:** Protozoa, abortion, placentomas, goats.

## 1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

A placenta é considerada um órgão transitório (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) e é responsável pelas trocas gasosas e de metabólitos, além da capacidade de secretar hormônios e servir de barreira entre ambos os sistemas imunes, facilitando a sobrevivência do feto (ROA *et al.*, 2012).

Após fertilização, as células embrionárias chegam ao útero onde ocorre o processo de placentação, em que o córion entra em contato com o endométrio. Essas modificações que ocorrem durante a gestação na placenta epiteliocorial não são tão grandes quando comparadas às sofridas pelas placentas hemocorial (LAWN *et al.*, 1969).

A importância da placenta está em garantir a sobrevivência fetal, o que só ocorrerá se estiver íntegra, além disso, em se tratando de animais de produção, boas taxas de ganho de peso, fertilidade, e natalidade são de suma importância para a manutenção e viabilidade econômica de um rebanho. Alguns fatores podem influenciar diretamente no desempenho reprodutivo, dentre elas causas nutricionais e mesmo doenças que afetam a reprodução podem se traduzir em prejuízos econômicos graves, tais como brucelose, toxoplasmose, leptospirose e neosporose.

Além disso, distúrbios de maturação da placenta podem estar envolvidos, impedindo a implantação do embrião, levando à reabsorção deste e repetição de cio, ou desenvolvimento fetal adequado, ocasionando abortos.

A transmissão tanto da toxoplasmose quanto da neosporose pode ocorrer por via horizontal, através da ingestão de oocistos, presentes como contaminantes em água ou alimentos, ou por via vertical, talvez a mais importante do ponto de vista epidemiológico. Nesta via, a infecção pode ocorrer antes da gestação e causar problemas, sendo denominada de recrudescência. Pode ocorrer também durante a gestação e causar problemas como abortos, crias nascidas fracas ou natimortos e animais saudáveis (DUBEY, 2010).

Nesses casos, a placenta se torna importante para diagnóstico e também para evidenciar fatos que ainda não são conhecidos sobre a epidemiologia das duas doenças. Além disso, a fase da gestação em que ocorre a infecção é decisiva para continuidade ou não da prenhez.

A esse respeito, estudos demonstram que fêmeas de várias espécies, infectadas no início da gestação, acabam por abortar ou absorver o embrião, enquanto fêmeas infectadas no meio do período gestacional podem abortar ou dar à luz fetos debilitados ou natimortos. Já no terço final da gestação, pode haver morte fetal ou nascimento de crias saudáveis. Desse modo, a maturação placentária ao longo do tempo e mesmo a imunocompetência fetal podem ser decisivos.

Com o intuito compreender melhor sobre as lesões placentárias que são desenvolvidas frente à infecção por esses protozoários, objetivou-se estudar sobre os danos placentários em diferentes fases gestacionais em infecções natural e experimental.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O termo placenta é originário do grego *plakous* ou *plakoûta*, que significa “bolo redondo”, referência ao bolo tradicional da culinária grega. No século XVI, já havia indícios do uso deste termo para designar o órgão que hoje conhecemos como placenta. Em seu livro “*De Re anatômica*”, Realdus Columbus, discípulo de Versalius, utiliza a expressão “*in modum orbicularis placentae*”, que pode ser traduzida como: a modo de um bolo redondo (SKINNER, 1961). A partir dessa expressão, muitos outros estudiosos e anatomistas adotaram o termo placenta, que até hoje é utilizado.

A placenta é um órgão transitório composto por tecido fetal e materno, cuja função é transportar nutrientes e metabólito entre mãe e feto (PAZINATO *et al.*, 2016) e assegurar o desenvolvimento do embrião e a viabilidade do feto (SCHOENAU *et al.*, 2005), principalmente em se tratando de mamíferos. É formada por mucosa uterina e córion fetal, e permite trocas gasosas e de metabólitos, além da capacidade de secretar hormônios e servir de barreira entre ambos os sistemas imunes, facilitando a sobrevivência do feto (ROA *et al.*, 2012). Além dessas funções, a placenta também possui função endócrina, pois produz hormônios como as gonadotrofinas coriônicas, corticotropina coriônica estrógenos e progesterona (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Normalmente, esse desenvolvimento placentário necessita de extensa angiogênese para suportar as demandas metabólicas do feto (BAIRAGI *et al.*, 2015). Durante o processo de placentação em ruminantes, os cotilédones entram em íntimo contato com áreas especializadas da mucosa uterina denominadas de carúnculas, essas uniões são denominadas de placentomas (AMOROSO, 1952; IGWEBUIKE, 2009).

A placentação em mamíferos é do tipo corioalantóide, e pode ser classificada em tipos de acordo com a formação das vilosidades coriônicas em placenta difusa, placenta cotiledonar, placenta zonária e placenta discoidal (HAFEZ, 1954).

A placenta de cabras é classificada quanto à forma da área de junção materno-fetal como zonária cotiledonária, quanto às interdigitações materno-fetal é vilosa, e quanto às camadas de barreira inter-hemática é sinepiteliocorial (LEISER; KAUFMANN, 1994). Foi também incluída nesta última categoria de sinepiteliocorial, visto que este tipo de arranjo implica em perda de epitélio uterino, resultado da migração e da fusão das células binucleadas pertencentes ao trofoblasto e células do epitélio uterino (WOODING, 1992).

O desenvolvimento placentário, denominado de placentação ou nidação, compreende a adesão do embrião ao epitélio uterino (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

## **2.1 Placentação em ruminantes**

Após a fertilização inicia-se a clivagem do zigoto e formação dos blastômeros. Essas células embrionárias são impulsionadas pelos cílios da tuba uterina para o útero (NODEN; LAHUNTA, 1990). Ao chegarem ao útero, as células embrionárias se apresentam como um conjunto compacto denominado de mórula. Com o acúmulo gradual de líquido no centro da cavidade da mórula e os blastômeros cada vez mais afastados, ocorre a diferenciação em blastocisto, fase inicial do embrião no útero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os blastômeros se organizam em uma camada periférica que pode ser denominada de trofoblasto. Alguns desses blastômeros se localizam internamente à camada de trofoblasto, chamada de embrioblasto. Após entrar em contato com o endométrio, a zona pelúcida é removida nessa fase, até a completa interação das células do trofoblasto com a superfície endometrial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Alguns elementos primitivos são formados nesse início da placentação; o saco vitelínico é formado em todos os mamíferos e é o local de formação dos primeiros vasos fetais, permanecendo funcional durante a gestação apenas em mamíferos mais primitivos (RAMSEY, 1982).

Nos ruminantes, por exemplo, as ligações do córion com o epitélio endometrial em pontos específicos, macroscopicamente, são caracterizadas como uma placenta do tipo corioalantóide e cotiledonária, visto que durante a gestação o córion desenvolve projeções para as carúnculas uterinas (LACERDA, 2006). Com o desenvolvimento embrionário, ocorrem modificações nas interfaces materno-fetais, formando placentomas. Dessa forma, o córion invade o corpo e os cornos uterinos, possuindo maior desenvolvimento no corno uterino gravídico (KING; ATKINSON, 1987).

Em cabras, o córion possui uma área de implantação do funículo umbilical, na região central da placenta, que varia de 1cm a 6cm de diâmetro e é denominada de hilo da placenta. Nessa região específica, os cotilédones são poucos e se dispõem em toda placenta em 4 fileiras, sendo observadas duas fileiras a cada lado do funículo umbilical,

possuindo formatos que variam: ovóide, circular, elíptica, piriforme e reniforme (NEVES *et al.*, 1999).

## 2.2 Descrição histológica na placenta

O epitélio materno é classificado como colunar ou cuboidal, e, ao final da gestação, vai se tornando mais achatado e, até mesmo, desaparecendo em algumas áreas (BJORKMAN; SOLLEN, 1960). Por sua vez, o endométrio é caracterizado por pontos de ligação materno-fetal, as carúnculas e as áreas intercarunculares (BASHA; MOHAMMAD, 2013).

Cortes histológicos de placentomas em ovelhas prenhes com 30-40 dias de gestação demonstraram que o epitélio placentário é sinepiteliocorial, com presença de células binucleadas, cujas fusões se encontram restritas à fronteira celular e ao epitélio uterino. Esse epitélio possui formato cuboidal e as células binucleadas estão presentes de forma bem definida, na membrana basal e nas proeminências materno-sinciciais (MAJEED *et al.*, 2012).

O endométrio em algumas áreas revela criptas profundas onde as vilosidades coriônicas são superficiais. O estroma revela células gigantes de Hofbauer, com formatos arredondados ou ovais. As vilosidades são recobertas por citotrofoblastos poliédricos, cujo citoplasma é acidofílico e, entre este e o epitélio basal, são encontrados capilares sanguíneos. As células gigantes ou binucleadas sofrem estratificação em algumas regiões das vilosidades (BASHA; MOHAMMAD, 2013).

Nas áreas intercarunculares, há predomínio de endométrio, caracterizado por epitélio simples cúbico ou prismático e, na lâmina própria, tecido conjuntivo frouxo. Já o miométrio, possui camada circular interna e externa de músculo liso e, no perímetro, uma camada serosa bastante vascularizada. Além de células linfóides próximas às glândulas endometriais (MARQUES *et al.*, 2007).

Foram descritas alterações vasculares como edema, hiperemia e hemorragias no terço médio de gestação, cerca de 80 dias (MAJEED *et al.*, 2012), além de deposição de hemossiderina nas vilosidades e hiperplasia das vilosidades fetais e moderado infiltrado neutrofílico (IGWEBUIKE, 2009). Já nas vilosidades terminais trofoblásticas, há alta densidade de células gigantes (BASHA; MOHAMMAD, 2013).

O endométrio de cabras possui carúnculas, cujo epitélio são colunas simples, possuindo áreas intercarunculares, onde não há a ocorrência deste epitélio. As

vilosidades terminais são recobertas por células trofoblásticas sobre tecido conjuntivo, com alta densidade de células gigantes (BASHA; MOHAMMAD, 2013).

As vilosidades coriônicas são bastante vascularizadas e, a partir de 20-30 cm de tamanho do feto, estas se tornam mais longas e delgadas (BASHA MOHAMMAD, 2013). Dos 40-50 dias de gestação, houve aumento considerável na vascularização caruncular, com aumento de número de capilares e diâmetro destes, além de hiperplasia endometrial (MAJEED et al., 2012). Esses autores ainda puderam observar a migração das células binucleadas com o epitélio materno.

Aos 80 dias de gestação, os placentomas cresceram em número e tamanho, na espécie ovina, consistindo numa sobreposição das vilosidades coriônicas e das cristas maternas, separadas por septos (IGWEBUIKE, 2009)

Segundo Oliveira et al. (2010), a multiplicação celular nos cotilédones e carúnculas, bem como a vascularização que estes possuem, permite a diferença de tamanho e forma dos placentomas durante a gestação.

Em estudo realizado, foi demonstrado que a deficiência de ferro durante o desenvolvimento fetal em várias espécies resulta em prejuízos ao longo do tempo para recém-nascidos, como diminuição das funções cerebrais e comprometimento do sistema imune (MCARDLE *et al.*, 2003).

Os ruminantes possuem áreas determinadas denominadas de zonas arcadas ou áreas hematófagas, onde o ferro é extravasado do sangue materno e utilizado pelo feto na hematopoiese. Esses extravasamentos sanguíneos ocorrem em várias espécies (bubalina, bovina, ovina, canina e felina) e possuem aspecto celular diferenciado (CAZERTA *et al.*, 2007).

A zona arcada é uma região onde o topo das vilosidades maternas estão em contato com a base das vilosidades fetais. Trata-se de um epitélio especializado em fagocitose de hemácias ou de pigmentos hematógenos, cuja ação pode ser caracterizada pela presença de eritrócitos fagocitados no interior de células epiteliais (CAZERTA *et al.*, 2007).

Além disso, nessas áreas de contato de epitélio uterino com epitélio coriônico, as fusões celulares permitem que ocorra a placentação, em ruminantes. Desse modo, a placenta de bovinos é caracterizada por células trofoblásticas mononucleadas, binucleadas e trinucleadas (KLISCH *et al.*, 1999).



*Lee et al.* (1986) observaram em seu trabalho que há pelo menos duas subpopulações de células binucleadas em ovinos, através da avaliação de anticorpo monoclonal (mAb) 'SBU-3.

As células binucleadas, ou também denominadas de células trofoblásticas gigantes, aparecem primeiramente na parede de blastocisto pré-implantado, invadindo o endométrio, por volta do 22º dia da gestação (IGWEBUIKE, 2004).

Essas células apresentam papel fundamental na ligação materno-fetal, e são extremamente importantes para o estabelecimento e manutenção da gestação (WATHES; WOODING, 1981).

Em ruminantes, as células trofoblásticas binucleadas são maiores que as células trofoblásticas epiteliais, e possuem dois núcleos com formato arredondado e desenvolvem grânulos citoplasmáticos característicos quando alcançam seu estágio de maturação (WINSATT, 1980).

Aos 80 dias de gestação, o citotrofoblasto e as células gigantes são observados na periferia da vilosidade em contato com o epitélio uterino (PINTO *et al.*, 2007).

Ao longo da gestação, dos 150 aos 210 dias em bovinos, as células trofoblásticas gigantes se fusionam com o epitélio materno. Nesse período, ocorre também o desenvolvimento capilar, ocupando quase todo o espaço mesenquimal da vilosidade fetal. Aos 150 dias, a cromatina dessas células se condensa e seu núcleo vai se tornando picnótico, o citoplasma é reduzido com perda do aspecto granular, e a membrana plasmática também possui contorno alterado. Entre 90 e 240 dias, observa-se aumento acentuado da vascularização e diminuição destas células (PINTO *et al.*, 2008).

Em seu estudo, Cazerta *et al.* (2007) identificaram que em bovinos, nas áreas de hematomas, havia sangue materno extravasado para o interstício e que, justamente nestas áreas, as células que margeavam possuíam vesículas lipídicas e pigmentos hematógenos no citoplasma. Além disso, as células binucleadas foram marcadas intensamente na reação de PAS.

Quando esses aspectos celulares são observados a nível ultraestrutural, torna-se possível a visualização das células trofoblásticas e uma análise mais aprofundada acerca de suas organelas e mesmo da organização no tecido placentário. Os trofoblastos em ruminantes têm importante papel na formação de estruturas e secreções em interface materno-fetal, tanto no estabelecimento quanto na manutenção da gestação (WATHES; WOODING, 1981).

Na maioria das espécies, a implantação embrionária induz uma resposta caracterizada por alterações no estroma endometrial, onde as células fibroblásticas se transformam em grandes células decíduais ativas, que são componentes importantes da porção materna da placenta (CROSS; MERCER, 1998).

O epitélio viloso consiste em duas camadas celulares: o sinciciotrofoblasto adjacente à circulação materna e um citotrofoblasto de células individuais subjacentes. Durante a gravidez, a área superficial das vilosidades aumenta drasticamente como resultado da divisão de células citotrofoblásticas e corre a sua diferenciação em sinciciotrofoblasto (CROSS; MERCER, 1998).

As células trofoblásticas gigantes estão presentes desde a implantação até o parto. Essas células apresentam inclusões citoplasmáticas cinza-claro, cujos grânulos secretores contém material proteico ou glicoproteico, encontrados de forma abundante em células trofoblásticas maduras. Os grânulos possuem aspecto heterogêneo com diferentes eletrodensidades e estão dispersos no citoplasma das células trofoblásticas e encerram em seu interior produtos secretores como proteínas e lipídeos (PINTO *et al.*, 2008).

### 2.3 Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* e o *Neospora caninum* são parasitas do filo apicomplexa que causam várias doenças em várias espécies hospedeiras (INNES *et al.*, 2007).

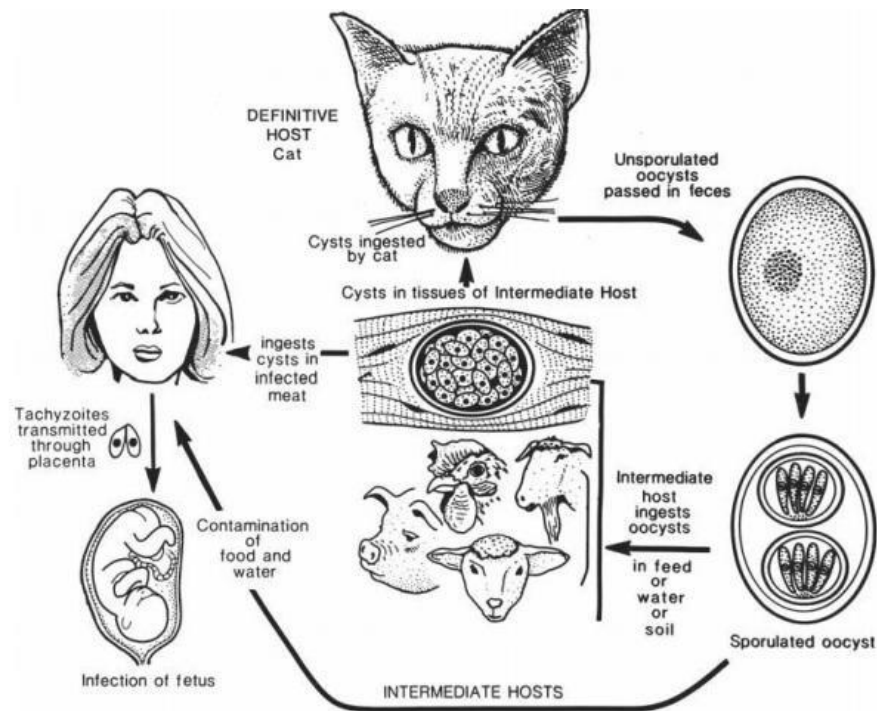
Dentre os animais domésticos, os caprinos são os mais susceptíveis ao *T. gondii* (DUBEY, 1989), causando danos reprodutivos em vários países (DUBEY *et al.*, 1986): Estados Unidos (MOELLER, 2001); Espanha (PEREIRA-BUENO *et al.*, 2004); Jordânia (ABU-DALBOUH *et al.*, 2012); Turquia (ATMACA *et al.*, 2012); Brasil (PEREIRA *et al.*, 2013).

Esses protozoários são parasitos intracelulares obrigatórios do Filo *Apicomplexa*, família *Sarcocystidae*, que podem acometer animais domésticos e o homem (DUBEY; BEATTIE, 1988).

O *N. caninum* é eliminado em forma de oocistos nas fezes de cães e coiotes, que funcionam como hospedeiros definitivos do protozoário (MCALLISTER *et al.*, 1998).

Já na toxoplasmose, os felinos são os hospedeiros definitivos, e qualquer animal de sangue quente pode ser hospedeiro intermediário (FRENKEL *et al.*, 1970) conforme **figura 1**.

**Figura 1 - Ciclo da toxoplasmose**



Fonte: Dubey, 1998, p.268.

Os dois protozoários em seu ciclo passam pelas fases de taquizoítos, bradizoítos em cistos teciduais e esporozoítos, em oocistos, nos hospedeiros intermediários (DUBEY; LINDSAY, 2006).

Tanto o *N. caninum* quanto o *T. gondii* são capazes de causar prejuízos à pecuária, a saber: morte embrionária e reabsorção, morte fetal, mumificação, aborto ou mesmo morte neonatal (DUBEY *et al.*, 2007; DUBEY; CARPENTER, 1993).

Em estudo retrospectivo realizado entre os anos de 1991 e 1998, na Califórnia, foram relatados 4% de casos de aborto causados por protozoários em caprinos, dos 211 casos atendidos no período (MOELLER, 2001).

A presença de um parasita que cause prejuízo placentário é um fator determinante na patogênese para que ocorra o aborto (DUBEY, 2009).

## 2.4 Neosporose

A neosporose vem ganhando destaque frente às doenças reprodutivas em rebanhos (DUBEY *et al.*, 1988). Estima-se que no estado da Califórnia (EUA), os prejuízos sejam em torno de 35 milhões de dólares/ano (ANDREOTTI, 2001).

Em 1984, o *Neospora caninum* foi isolado em cães na Noruega, diferenciado do *Toxoplasma gondii* e reconhecido como um novo gênero (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984). O *Neospora caninum*, pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae (DUBEY *et al.*, 1988), trata-se de um protozoário intracelular que, até 1988, era confundido e diagnosticado de forma errônea como *Toxoplasma gondii* (DUBEY *et al.*, 1988).

A neosporose está associada a encefalites e miosite em cães entre dois e seis meses de idade (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984), e reportada em várias espécies domésticas: caprinos, ovinos e equinos (DUBEY, 2003).

Trata-se de uma importante causa infecciosa de aborto em vacas leiteira em países industrializados, cuja prevalência fica em torno de 40% (DUBEY; SCHARES, 2011).

No Brasil, foram relatados casos de abortos no Rio Grande do Sul (CORBELLINI *et al.*, 2000) e sul de Minas Gerais (ORLANDO *et al.*, 2013); estudos soroepidemiológicos em bovinos (25,15%) na região de Votuporanga estado de São Paulo (COSTA *et al.*, 2001); em caprinos (17,44%) no Estado de São Paulo (MODOLO *et al.*, 2008); em ovinos, na Amazônia Ocidental Brasileira (AGUIAR *et al.*, 2004); em ovinos: no Paraná (ROMANELLI, 2002); Bahia (OTERO *et al.* 2003); São Paulo (FUGLIUOLO, 2003). Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, em bovinos (RAGOZO *et al.*, 2003);

No ciclo biológico, os hospedeiros definitivos do *N. caninum* são canídeos (MCALLISTER *et al.*, 1998) e os hospedeiros intermediários são bovinos, ovinos, caprinos e equinos (DUBEY, 2003).

Este é um coccídeo que possui ciclo de vida heteroxeno, intracelular (DUBEY; BARR; BARTA *et al.*, 2002) e pode ser caracterizado por três fases: cistos teciduais, oocistos e taquizoítos. Os cistos teciduais possuem forma arredondada ou oval e são encontrados principalmente em sistema nervoso central ou musculatura (DUBEY; SREEKUMAR; KNICKMAN *et al.*, 2004). O oocisto é o estágio de resistência ambiental do parasito, e é excretado nas fezes de cães (DUBEY *et al.*, 1988), raposas (MCALLISTER *et al.*, 1998) e coiotes (GONDIM *et al.*, 2004).

Os taquizoítos podem ser encontrados parasitando diversos tipos celulares, já foram descritos macrófagos, células neurais, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células tubulares renais e hepatócitos (BJERKAS; PRESTHUS, 1989; SPEER; DUBEY, 1989).

A infecção de hospedeiros definitivos se dá através da ingestão de tecidos de herbívoros contendo bradizoítos (DUBEY *et al.*, 2007).

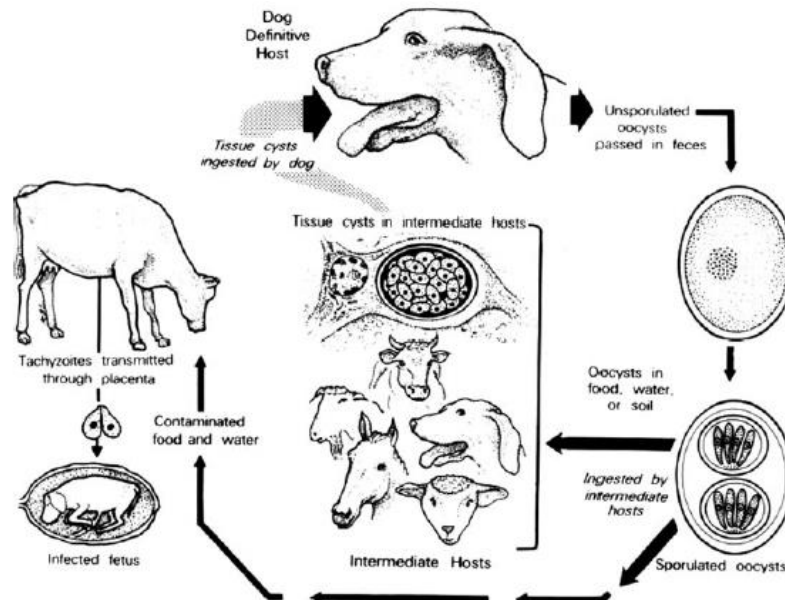
O ciclo sexuado deste protozoário ocorre apenas nos hospedeiros definitivos, porém a fase enteroepitelial em cães e coiotes ainda não foi elucidada (DUBEY *et al.*, 2002).

O oocisto não esporulado é eliminado nas fezes de cães e coiotes e cerca de 24 horas depois esporula no ambiente (LINDSAY *et al.*, 1999).

Nos herbívoros, a neosporose pode ser caracterizada por duas vias de transmissão: a horizontal e a vertical. Na transmissão horizontal, a infecção ocorre pela ingestão de oocistos na pastagem, que foram eliminados por cães ou coiotes (GONDIM *et al.*, 2004). Já a transmissão vertical, é caracterizada por transmissão via transplacentária, e parece a principal via de manutenção desta doença nos rebanhos (ANDERSON *et al.*, 2000) (**Figura 2**).

A transmissão vertical pode ocorrer de forma endógena, quando a primeira infecção ocorre durante a gestação, denominada de transmissão transplacentária exógena. A outra forma de transmissão placentária é a endógena e ocorre pela infecção crônica por *N. caninum*, em uma fêmea prenhe infectada anteriormente, e durante a gestação ocorre o fenômeno de recrudesência. Essas duas formas de infecção têm consequências clínicas e epidemiológicas diferentes (WILLIAMS *et al.*, 2009).

**Figura 2 - Ciclo biológico de *N. caninum***



Fonte: DUBEY, 2003, p.2.

Em seu estudo, Bjorkman *et al.* (1996) realizaram um levantamento da progênie de vacas leiteiras soropositivas para *N. caninum* na Suécia, e concluíram que todos os animais infectados provinham da progênie de duas vacas positivas.

Mesmo sendo os bovinos importantes hospedeiros do *N. caninum*, já se tem relatos de transmissão transplacentária em pequenos ruminantes (DUBEY *et al.*, 1990).

## **2.5 Lesões placentárias causadas por protozoários**

O desenvolvimento vascular placentário é extremamente importante para o estabelecimento do processo da placentação, favorecendo o crescimento embrionário e posteriormente fetal. Porém, alguns fatores podem influenciar negativamente nesse processo, promovendo falhas vasculares e culminando com retardo no desenvolvimento embrionário (GRAZUL-BILSKA *et al.*, 2010).

Alguns fatores podem influenciar negativamente a fertilidade e o crescimento fetal, além do desenvolvimento placentário. Estudos revelam que a gestação comprometida em ovinos promove a redução do peso fetal e está associada ao tamanho reduzido da placenta e do útero gravídico, bem como alterações no fluxo sanguíneo no cordão umbilical e no desenvolvimento vascular e na função placentária (REYNOLDS *et al.*, 2010; REYNOLDS *et al.*, 2014).

Algumas enfermidades podem causar lesões placentárias graves, resultando em abortos, porém no Brasil não há ainda estimativas de custos (NEGRÃO, 2006). Entre as perdas econômicas relacionadas, estão: o aborto e a baixa taxa de prenhez representam 27,3% da receita total potencial na venda de bezerros, com redução na rentabilidade de R\$66.372,39 para um sistema produtivo com novilhas (BARROS *et al.*, 2010).

É uma doença parasitária causada pelo protozoário *Neospora caninum*, que vem sendo estudada em vários países, incluindo o Brasil (DUBEY *et al.*, 1996).

Dubey *et al.* (2007) verificaram que diversos métodos de diagnósticos podem ser utilizados para a detecção do agente como o ELISA e teste de aglutinação. Outras técnicas de diagnóstico podem ser empregadas, como, por exemplo, a microscopia de transmissão eletrônica (BITTENCOURT, 2008).

Placentites não supurativas foram às lesões histológicas encontradas em ovinos infectados experimentalmente (MCALLISTER *et al.*, 1996). Buxton (1998) descreveu

lesões semelhantes em placenta, cotilédones, coração, pulmão e fígado. Além disso, há também descrição histológica de necrose e mineralização cotiledonária em placenta de cordeiros abortados (DUBEY; LINDSAY, 1990).

Em situações em que há restrição de nutrientes durante a gestação, ocorre uma diminuição da resistência arterial uterina e aumento da resistência vascular umbilical (REYNOLDS *et al.*, 2013), o que pode indicar que as funções vasculares da placenta estão comprometidas (BAIRAGI *et al.*, 2016).

Segundo Barr *et al.* (1991), as lesões placentárias consistem em áreas focais de necrose com lesões inflamatórias não supurativas, com possível presença de bradizoítos no interior dos trofoblastos.

Para avaliação da função e maturação placentária, Nunes *et al.* (2001) quantificaram a apoptose de células trofoblásticas.

A detecção de células em apoptose pode ser realizada através de características morfológicas, como células retraídas, com cromatina condensada, retração de núcleo ou fragmentação deste (CAMPOS *et al.*, 2004).

Já na necrose, essa condensação ocorre de forma mais grosseira, levando à ruptura nuclear. Diferentemente da apoptose, em que há condensação da cromatina, ocorre de maneira periférica à carioteca, com fragmentação nuclear, sem ruptura (STAUNTON; GAFFNEY, 1998).

## **2.6 Métodos de diagnóstico para infecções causadas por *T. gondii* e *N. caninum***

O diagnóstico clínico não é específico quando se trata de casos de toxoplasmose e neosporose, por isso são necessários outros métodos para ter certeza de qual agente há queixas. Assim, os diagnósticos biológicos, serológicos e histológicos devem ser utilizados para se chegar ao diagnóstico definitivo (DUBEY, 2010).

A neosporose e toxoplasmose podem ser diagnosticadas através de métodos indiretos, que evidenciam a presença de anticorpos séricos em animais infectados: Soroaglutinação, Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI); ou pelos métodos diretos que possibilitam detectar a presença do agente em tecidos ou no soro, como Imunohistoquímica (IHQ) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (MARTINS *et al.*, 2011).

### 2.6.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A PCR (reação em cadeia de polimerase) é uma técnica mais sensível e tem sido utilizada para o diagnóstico da neosporose em amostras de órgãos como cérebro, músculo esquelético, placenta e coração (DUBEY; SCHARES, 2006; BENAVIDES *et al.*, 2012). E também pode ser utilizada em casos de toxoplasmose, visto que é uma técnica muito sensível, específica e de rápida execução (DUBEY *et al.*, 2010).

Há também relatos de casos de cabras infectadas naturalmente por *N. caninum* através da PCR em músculos esqueléticos e sistema nervoso (NAKAGAKI *et al.*, 2016). Além disso, segundo Hassig *et al.* (2003), abortos em pequenos ruminantes também têm sido relatados.

A detecção de *N. caninum* pode ser feita a partir de transcrito interno de região espaçadora ITS1, primers externos TgNN1-TgNN2 e primers internos NP1 – NP2 (REGIDOR-CERRILLO *et al.*, 2014).

Alguns marcadores genéticos utilizados para diagnóstico de *T. gondii* foram listados: SAG1 (5'+3'), SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22–8, c29–2, L358, PK1, Apico, e TUB2 (DUBEY, 2010).

Há também na literatura descrições acerca de testes para detecção de DNA de *T. gondii* em amostra de cérebro, baço, pulmão, fígado, rim, placenta e fluidos fetais de 53 fetos e natimortos de 32 fazendas na Espanha, em ovinos. A técnica utilizada foi o PCR Nested com região do espaçador transcrito interno (ITS1) e transcrição 18S-5.8S rRNA (HURTADO *et al.*, 2001).

A detecção do DNA de *N. caninum* em placentomas foi demonstrada em 97% das amostras do G1 (29/30), 83% no G2 (29/35) e 89% no G3 (31/35). Além de placentomas, em outros tecidos maternos foi detectado o DNA do parasito, como em linfonodos íliofemorais e mesentéricos. Em tecidos fetais, foi possível a identificação do DNA em cérebro, fígado, coração e esquelético e músculo dos fetos (ARRANZ-SOLÍS *et al.*, 2015).

Em outro estudo, para o diagnóstico de *T. gondii*, foram utilizadas amostras de cérebro, fígado e coração de fetos, e submetidas à técnica de nested-PCR (LIN *et al.*, 2000; PESCADOR *et al.*, 2007).



A PCR é capaz de detectar DNA dos protozoários em tecidos fetais e maternos. Desse modo, trata-se de uma ferramenta valiosa e relativamente rápida para o diagnóstico de aborto (HURTADO *et al.*, 2001).

### **2.6.2 Histopatologia**

Na histopatologia, podem ser analisadas amostras de animais suspeitos de infecções por *N. caninum* em órgãos como: placenta, cérebro, coração, fígado, pulmões, músculos esqueléticos e linfonodos que devem ser fixados em formol tamponado a 10% (ARRANZ-SOLÍS *et al.*, 2015).

Há também relatos de casos de diagnóstico de cabras infectadas naturalmente por *N. caninum* através de histopatologia em músculos esqueléticos e sistema nervoso (NAKAGAKI *et al.*, 2016) e relacionado a abortos em pequenos ruminantes (HASSIG *et al.*, 2003).

Apesar da PCR ser considerada uma técnica mais sensível para o diagnóstico da neosporose, a caracterização histopatológica das lesões em órgãos como cérebro, músculo esquelético, placenta e coração é necessária para a confirmação da doença (DUBEY; SCHARES, 2006).

Na Nova Zelândia, relatos de abortos em ovelhas, com descrição de mineralização multifocal do estroma, necrose e infiltração de neutrófilos em carúncula materna, com confirmação de neosporose através de ELISA e PCR (HOWE *et al.*, 2008).

### **2.6.3 Testes sorológicos**

Vários são os testes sorológicos capazes de diagnosticar IgG e IgM para *N. caninum* e *T. gondii*, como: Teste de corante Sabin-Feldman (DT); hemaglutinação indireta (IHA); anticorpo fluorescente indireto (IFA); teste de aglutinação modificado (MAT); aglutinação em látex (LA); imunoabsorvente ligado a enzima ensaio (ELISA), e fixação de complemento (CF) (DUBEY, 2010). Dentre todos esses testes citados, o ELISA é mais sensível por detectar de forma mais segura um maior número de animais soropositivos (SARTOR *et al.*, 2003).

Já a RIFI (IFAT) é considerada uma técnica mais específica, porém o ponto de corte para aceite de resultados positivos deve ser acima de 1:200 (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Análises sorológicas através da RIFI foram utilizadas para detecção de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* em fluidos e soros (ÁLVAREZ-GARCÍA *et al.*, 2003). Os títulos de anticorpos maternos foram considerados positivos de 1:1600 a 1:3200 em G1, 1:3200 a 1:6400 em G2 e 1:200 a 1:1600 em G3 (ARRANZ-SOLÍS *et al.*, 2015).

Em algumas áreas do mundo, as taxas de prevalência de *N. caninum* em caprinos pode chegar a 25% (DUBEY; SCHARES, 2011; LIU *et al.*, 2015).

É possível avaliar os níveis de anticorpos IgG contra *N. caninum* através do teste ELISA indireto (PORTO *et al.*, 2017).

As técnicas de RIFI e ELISA são utilizadas em diversos países para o diagnóstico de *N. caninum*, como Argentina, Brasil, Austrália, Bélgica, Canadá, Estados Unidos, Espanha, Alemanha, entre outros (DUBEY *et al.*, 2007).

Além das técnicas citadas, pode-se ainda utilizar o MAT (Teste de Aglutinação Modificada). Trata-se de um teste macroscópico que é utilizado, validado e de fácil realização para diagnóstico em diferentes espécies animais (SILVA; CUTOLO; LANGONI, 2002).

Em estudo sobre a comparação entre a RIFI e o MAT para detecção de anticorpos contra *T. gondii*, foi demonstrado que no MAT o ponto de corte na diluição 1:50 apresentou concordância a RIFI (COLA *et al.*, 2010).

#### **2.6.4 Imunohistoquímica**

Estudos utilizando amostras de tecidos para análise em imunohistoquímica (IHQ) têm sido realizados para a identificação de imunomarcações para *N. caninum* (GIBNEY *et al.*, 2008) e *T. gondii* (DUBEY, 2010).

Gibney *et al.* (2008), em seu trabalho, conseguiram detectar a imunomarcação em trofoblastos de vacas infectadas por *N. caninum*.

Para a realização da IHQ, os tecidos devem ser fixados em formol tamponado e embebidos em parafina através da técnica descrita por Dubey (2010); os fragmentos devem ser banhados com anticorpos de Coelho policlonal, pois são melhores que os

anticorpos monoclonais. Essa técnica pode ser utilizada também para distinguir taquizoítos de bradizoítos, tanto para *T. gondii* quanto para *N. caninum*.

Áreas de lesões necróticas em septos carunculares foram imunomarcadas para *N. caninum* na IHQ, detectando a presença do protozoário como causador das lesões encontradas na histopatologia (BENAVIDES *et al.*, 2012).

Algumas metodologias para detecção de cistos teciduais de *T. gondii* foram desenvolvidas, utilizando antígenos específicos dessa fase do parasito e anticorpos monoclonais (TOMAVO *et al.*, 1991; WEISS *et al.*, 1994).

A imunodetecção permite observações precisas de estágios específicos do protozoário e, é uma importante ferramenta para determinar a capacidade de agentes a induzirem a formação de cistos teciduais (DUBEY *et al.*, 1998).

Esta técnica pode ser utilizada para imunodetecção de *T. gondii* (DUBEY, 2010) e *N. caninum* em tecidos (BARR *et al.*, 1991).

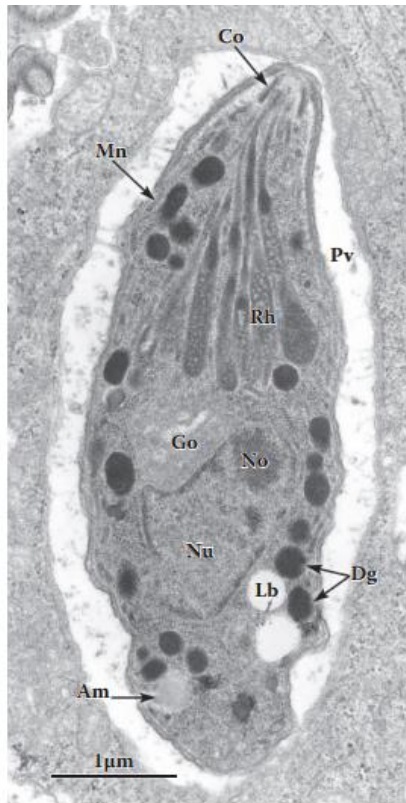
### 2.6.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) consiste em análise ultraestrutural de tecidos. Em seu estudo, Gibney *et al.* (2008) utilizaram amostras de placenta de vacas para diagnóstico de *N. caninum*. Para análise em MET, devem ser fixadas em glutaraldeído a 5% em cacodilato tamponado 0,1M e armazenadas a 4 ° C, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, incubadas em acetato de uranila e impregnadas com Époxi-resina.

Várias células foram descritas já infectadas por taquizoítos de *N. caninum*, como macrófagos, miócitos, células endoteliais, fibroblastos, células neurais, células tubulares renais e hepatócitos (DUBEY, 1993; BJERKAS; PRESTHUS, 1989; DUBEY, 1989). No interior do citoplasma dessas células, ocorre a formação pela invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo, observado em microscopia eletrônica. Em infecções *in vivo*, os vacúolos parasitóforos não foram observados (DUBEY, 1989).

A estrutura interna e as organelas de taquizoítos e bradizoítos de *N. caninum* (DUBEY; LINDSAY, 1996) e *T. gondii* são bastante semelhantes, e podem ser observados em MET: microtúbulos, anéis apicais, anel polar, mitocôndrias, micronemas, roptrias e grânulos densos presentes no citoplasma (DUBEY, 2010). **(Figura 3).**

A MET ainda pode ser utilizada para observação de cistos teciduais, porém é difícil obter dados quantitativos nesse tipo de análise devido à pequena quantidade de material usado no exame (GROSS *et al.*, 1996).



**Figura 3 - Taquizoíta de *T. gondii* observado em MET**

Organelas do taquizoíta. Am, grânulo de amilopectina; Co, conóide; Dg, grânulo elétron-denso; Go, complexo de Golgi; Mn, micronema; No, nucléolo; Nu, núcleo; Pv, vacúolo parasitóforo; Rh, roptria. Lb, lipídeo.

Fonte: Dubey *et al.* 1998, p. 272.

Os taquizoítos de *T. gondii* apresentam tamanho que varia entre 2 e 6 µm.

Os cistos teciduais possuem formato arredondado e podem ser encontrados em diversos órgãos como sistema nervoso (DUBEY *et al.*, 1990).

Os cistos teciduais de *T. gondii* apresentam aspecto bastante semelhante. Possuem formato esferóide e quase sempre não ultrapassam o diâmetro de 70 µm quando localizados no sistema nervoso central, enquanto que, quando localizados em músculo esquelético, são alongados e podem atingir até 100 µm de comprimento. Podem localizar-se também em órgãos, como pulmões, fígado e rins, porém são mais

prevalentes no sistema nervoso e muscular, incluindo o cérebro, olhos e músculos esqueléticos e cardíacos (DUBEY, 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a morfologia dos tecidos placentários em caprinos infectados por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*.

#### **3.2 Específicos**

- Coletar fragmentos de placentomas próximos e longe do cordão umbilical, bem como mensurá-los para verificação de diferenças entre os grupos;
- Avaliar lesões teciduais placentárias causadas por *N. caninum* a nível de microscopia eletrônica;
- Caracterizar as lesões placentárias causadas por *Toxoplasma gondii*.

## 4. ARTIGOS

### 4.1 Artigo 1

#### **Immunodetection of *Toxoplasma gondii* in placenta tissue of naturally infected goats**

Imunodeteccção de *Toxoplasma gondii* em tecido placentário de cabras naturalmente infectadas

(Formato para periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

**ABSTRACT-** Immunohistochemistry (IHC) is considered a rapid and accurate tool for the identification of protozoa such as *Toxoplasma gondii* in fetal and placental tissues. In this study we evaluated the immunodetection of *Toxoplasma gondii* in placental tissue from naturally infected goats. A total of 213 samples of goat placentas from a single herd with positive ELISA serology were collected. In the histopathology, 27 samples presented lesions suggestive of protozoal infection. After the histopathological evaluation, the immunohistochemistry technique was performed, obtaining 85.2% (23/27) of samples with positive marking. Immunodetection occurred in the lining epithelium of the chorionic villi and was classified according to the degree of intensity of the immunostaining. Immunostaining within the fetal blood vessels was also evidenced in 8.69% (2/23) of the samples. This study demonstrated that the IHQ technique behaved as a valuable tool in the diagnosis of *T. gondii* infection in placental tissue of naturally infected goats completing the diagnosis in a decisive way and adding greater value to the results obtained in the histopathological and serological analysis.

**INDEX TERMS:** Placenta, Goats, Toxoplamosis, Immunodiagnosis.

**RESUMO-** A imunohistoquímica (IHQ) é considerada uma ferramenta rápida e precisa na identificação de protozoários como *Toxoplasma gondii* em tecidos fetais e placentários. Neste estudo foi avaliada a imunodeteccção de *Toxoplasma gondii* em tecido placentário de cabras naturalmente infectadas. Foram coletadas 213 amostras de placentas de cabras procedentes de único rebanho com sorologia positiva ao ELISA, e analisadas na histopatologia destas, 27 amostras apresentaram lesões sugestivas de infecção por protozoários. Após a avaliação histopatológica procedeu-se a realização da técnica de imunohistoquímica, obtendo-se 85,2% (23/27) de amostras com marcação positiva. A imunodeteccção ocorreu no epitélio de revestimento das vilosidades coriônicas e foi classificada de acordo com o grau de intensidade da imunomarcação. Imunomarcação no interior dos vasos sanguíneos fetais também foi evidenciada em 8,69% (2/23) das amostras. Este estudo demonstrou que a técnica de IHQ se comportou como uma ferramenta valiosa no diagnóstico da infecção por *T. gondii* em tecido placentário de cabras naturalmente infectadas complementando de forma decisiva o diagnóstico e agregando maior valor aos resultados obtidos na análise histopatológica e sorológica.

## INTRODUÇÃO

Dentre as várias etiologias relacionadas a problemas reprodutivos em pequenos ruminantes, destaca-se a toxoplasmose causada por *Toxoplasma gondii*, protozoário pertencente ao filo Apicomplexa (Dubey, 2009). Trata-se de um protozoário intracelular obrigatório de distribuição mundial e de carácter zoonótico que acomete os pequenos ruminantes e outros mamíferos (Massala *et al.*, 2003). A doença também foi relatada como importante causa de prejuízos econômicos na caprinocultura (Munday e Mason, 1979). Os felídeos são considerados os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, e os oocistos liberados nas fezes desses animais infectam outras espécies animais por meio da transmissão horizontal. Nesta espécie, a transmissão vertical também pode ocorrer por via transplacentária (Dubey, 2010).

O sistema imune não elimina o *T. gondii*, que se aloja nos tecidos em forma de cistos que podem persistir por vários anos no hospedeiro. Alguns desses cistos podem se romper em períodos de imunossupressão, liberando os bradizoítos que posteriormente se convertem em taquizoítos (Dubey e Lindsay, 2006).

*Toxoplasma gondii* também pode comprometer o desenvolvimento do embrião culminando com sua morte e interferindo na taxa de reabsorção embrionária de cabras (Wanderley *et al.*, 2013). Além disso, esse protozoário também pode causar morte fetal, mumificação, abortos (Buxton, 1998) e nascimento de cabritos debilitados (Dubey, 1987).

As infecções por *T. gondii* vêm sendo relatadas em vários países do mundo por meio do diagnóstico nos fetos abortados (Charleston, 1994) como na região da Múrcia/Espanha, em cabras e ovelhas (Navarro *et al.*, 2016); em cabras (Caldeira *et al.*, 2004; Pescador *et al.*, 2007); na Jordânia, em cabras e ovelhas (Abu-Dalbouh *et al.*, 2012); ovelhas, na Turquia (Atmaca *et al.*, 2012) e na Argentina, cabras (Ungaza *et al.*, 2014).

Em um estudo retrospectivo sobre abortos na Califórnia foram analisados 211 casos em caprinos no período de 1991 a 1998; 30,5% foram de origem bacteriana, 2% virais, 0,5% fúngicas e 4% por protozoários. O diagnóstico dos abortos foi confirmado por meio da observação de taquizoítos nos tecidos por IHQ ou pela presença de anticorpos



com títulos elevados para o protozoário na técnica de aglutinação em látex (Moeller, 2001).

Exames laboratoriais com base em técnicas de pesquisa de antígenos teciduais para a confirmação da causa dos abortos são recomendados (Dubey, 2009), destacando-se a imunohistoquímica (IHQ) que apresenta bons resultados mesmo em animais com títulos baixos de anticorpos contra o agente (Dagleish *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013).

Considerando a escassez de estudos direcionados ao diagnóstico das causas de abortos em cabras no Brasil e a ausência de um padrão de diagnóstico por imunohistoquímica em tecido placentário de cabras, objetivou-se detectar *T. gondii* em tecido placentário de cabras naturalmente infectadas pela técnica de imunohistoquímica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (licença nº 122/2015).

O acompanhamento das cabras naturalmente infectadas por *T. gondii* foi realizado em uma propriedade no estado de Alagoas. As cabras eram criadas em sistema de manejo intensivo, alimentadas à base de silagem de milho ou capim elefante e concentrado comercial para as gestantes e lactantes e apresentaram histórico de surto recente de aborto. A mineralização fornecida era comercial e água proveniente de poço artesiano.

Inicialmente realizou-se um levantamento sorológico nas cabras deste rebanho, coletando-se 246 amostras de soro analisados na técnica de ELISA de acordo com o protocolo de Álvarez-García *et al.* (2003) para confirmar a infecção por *Toxoplasma gondii*. Após a confirmação de positividade no rebanho para este protozoário, seguiu-se o acompanhamento dos animais para coleta de amostras das placentas. Durante o parto foram coletadas amostras de 80 placentas que inicialmente foram submetidas ao método rotineiro de processamento e emblocamento em parafina e posteriormente foram submetidas à análise histopatológica para identificação de lesões compatíveis com *Toxoplasma gondii* segundo critério estabelecido por Buxton e Finlayson (1986). As amostras placentárias foram analisadas quanto à presença de áreas de necrose, infiltrados mononucleares e áreas de calcificação e posteriormente foram submetidas à técnica de IHQ (Pereira-Bueno *et al.*, 2004).

Para a realização da imunohistoquímica foram utilizados 27 fragmentos de placentas, sendo 22 com lesões compatíveis com toxoplasmose na histopatologia e

cinco sem lesões. Os cortes foram realizados em micrótomo e dispostos em lâminas previamente silanizadas. Inicialmente foi realizada a desparafinização e recuperação antigênica pela imersão em solução ácido cítrico (pH 6,0), bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 30-32% (30 volumes) e incubação com anticorpo anti-*Toxoplasma gondii* de caprino positivo, com diluição de 1:100. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado pela imersão em solução de leite desnatado a 6% diluído em tampão citrato. A IHQ foi realizada pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase com o *kit* comercial (DAKO LSAB2 System-HRP K0675, DAKO North America, USA) e contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados e as lâminas montadas com bálsamo do Canadá. Foram também utilizados como controles positivos e negativos fragmentos de placentas sabidamente positivas e negativas na IHQ para este protozoário.

As imunomarcações foram classificadas de acordo com a intensidade das reações na IHQ em discretas (+), moderadas (++) e severas (+++) de acordo com metodologia descrita por Costa *et al.* (2014).

## RESULTADOS

No rebanho estudado observou-se frequência de 86,6% (213/246) de cabras positivas a sorologia. Das 80 amostras de placenta coletadas, 22 amostras (27,5%) apresentaram lesões microscópicas ou macroscópicas características de infecções por *T. gondii*. As lesões macroscópicas nas placentas foram caracterizadas por áreas necróticas de coloração branco-amareladas nos cotilédones, caracterizando necrose não supurativa. Na análise histopatológica observaram-se lesões características de infecções por protozoários como áreas focais de necrose, infiltrados inflamatórios mononucleares e áreas de calcificação focal.

Na análise por IHQ, das 27 amostras de placenta analisadas, 23 (85,2%) apresentaram imunomarcação positiva, confirmando a infecção por *T. gondii*. Os resultados obtidos na histopatologia e IHQ (Tab. 1).

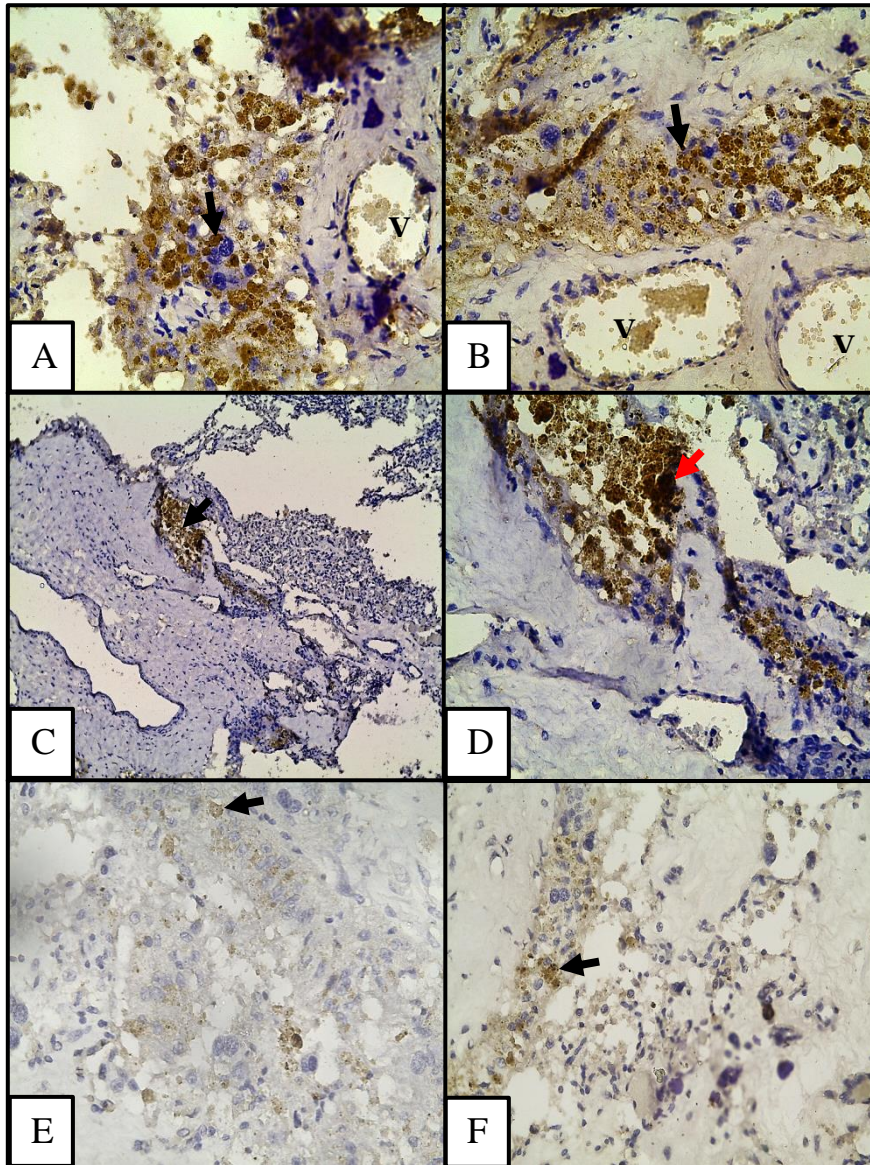
**Tabela 1.** Resultados das técnicas de ELISA, análise histopatológica e imunohistoquímica e suas respectivas frequências absoluta e relativa

<b>Identificação</b>	<b>ELISA (soro)</b>	<b>Análise histopatológica (placenta)</b>	<b>IHQ (placenta)</b>
Animal 1	+	+	+
Animal 2	+	+	+
Animal 3	+	+	+
Animal 4	-	+	-
Animal 5	+	+	+
Animal 6	-	+	+
Animal 7	-	+	+
Animal 8	-	+	-
Animal 9	+	+	+
Animal 10	+	+	+
Animal 11	-	+	+
Animal 12	+	-	+
Animal 13	+	+	+
Animal 14	+	-	+
Animal 15	+	+	-
Animal 16	+	+	+
Animal 17	+	+	+
Animal 18	+	+	+
Animal 19	+	+	+
Animal 20	+	+	+
Animal 21	+	+	+
Animal 22	+	+	+
Animal 23	+	-	+
Animal 24	+	-	+
Animal 25	+	+	+
Animal 26	+	-	-
Animal 27	+	+	+
Frequência absoluta	22/27	22/27	23/27
Frequência relativa	81,5%	81,5%	85,2%

+: positivo; -: negativo;

Das 80 amostras de placentas submetidas ao exame histopatológico, três foram provenientes de animais negativos a sorologia e que apresentaram lesões características de infecções por protozoários e, positivos na IHQ.

As reações positivas observadas na IHQ localizaram-se principalmente no epitélio de revestimento das vilosidades coriônicas, indicando a presença do agente neste local (Fig. 1).



**Figura 1.** Placentas de cabras naturalmente infectadas por *T. gondii* analisadas na imunohistoquímica.

Figura 1A e 1B. Severa imunomarcção no interior de células trofoblásticas (seta) e vasos sanguíneos (V). Hematoxilina de Harris. (x400). Figura 1C. Severa imunomarcção em epitélio de revestimento de vilosidade coriônica (seta). Hematoxilina de Harris. (x100). Figura 1D. Área ampliada com visualização de células trofoblásticas com severa imunomarcção em citoplasma (seta vermelha). Hematoxilina de Harris. (x400). Figura 1E. Discreta imunomarcção em citoplasma de trofoblastos (seta). Hematoxilina de Harris. (x400). Figura 1F. Moderada imunomarcção em epitélio de revestimento da vilosidade coriônica. Hematoxilina de Harris. (x400).

O epitélio de revestimento das vilosidades apresentou lesões com graus que variaram de reações moderadas a severa na imunohistoquímica e, uma amostra com imunomarcção discreta (Tab. 2). Foram visibilizadas células trofoblásticas vacuolizadas com imunomarcção positiva para *T. gondii*. Reação positiva no interior

de vasos sanguíneos placentários foi evidenciada em 8,69% (2/23), indicando a presença do parasito.

**Tabela 2.** Classificação das células imunorreativas em IHQ para *T. gondii*

<b>Identificação da amostra</b>	<b>Intensidade de células imunorreativas na IHQ</b>
Placenta 1	+++
Placenta 2	+++
Placenta 3	+++
Placenta 4	-
Placenta 5	++
Placenta 6	++
Placenta 7	+++
Placenta 8	-
Placenta 9	+++
Placenta 10	+++
Placenta 11	+++
Placenta 12	++
Placenta 13	++
Placenta 14	+++
Placenta 15	-
Placenta 16	+++
Placenta 17	+
Placenta 18	+++
Placenta 19	+++
Placenta 20	+++
Placenta 21	++
Placenta 22	++
Placenta 23	++
Placenta 24	++
Placenta 25	+++
Placenta 26	-
Placenta 27	+++

Graus de lesões: discreta (+), moderada (++) e severa (+++).  
Imunohistoquímica classificada de acordo com a intensidade da imunomarcção das células. (x400).

Das placentas com imunomarcção positiva, 4,4% (1/23) apresentaram reação discreta, 34,8% (8/23) moderada e 60,8% (14/23) severa.

## DISCUSSÃO

*T. gondii* é um importante agente envolvido em perdas reprodutivas na caprinocultura em diversas partes do mundo. Estudos realizados nos EUA (Moeller, 2001); Brasil

(Pescador *et al.*, 2007); Jordânia (Abu-Dalbouh *et al.*, 2012) e Argentina (Ungaza *et al.*, 2014) demonstraram a presença de *T. gondii* em aborto em cabras e a confirmação do diagnóstico é necessária para o controle dos surtos.

Neste estudo foram detectadas lesões associadas à infecção por *T. gondii* em amostras de cérebro, coração, fígado e placenta, caracterizadas por focos de infiltrado não supurativo com áreas de necroses multifocais em placentas com áreas necróticas focais com mineralização e presença de infiltrado inflamatório mononuclear. Na histopatologia, as áreas branco-amareladas nos cotilédones são caracterizadas por calcificação e necrose (Dubey, 1980). Estes achados são descritos como compatíveis nas infecções por protozoários e foram observados em 22 amostras de placenta examinadas em nosso estudo.

Destas 22 amostras placentárias que apresentaram lesões na histopatologia compatíveis para *T. gondii* e que foram submetidas à IHQ, juntamente com as cinco amostras que não apresentaram lesões características, 23 apresentaram imunomarcção em epitélio das vilosidades placentárias, confirmando a etiologia da toxoplasmose. Segundo Mota *et al.* (2008), a IHQ é uma técnica importante no diagnóstico da toxoplasmose, visto que os achados histopatológicos sugestivos da infecção por protozoários, inclusive, *Toxoplasma gondii* não são conclusivos.

Duas amostras (8,69%) apresentaram imunomarcção no interior de vasos sanguíneos placentários, indicando a presença do parasito e, possível transmissão vertical. Este achado corrobora com os resultados obtidos por Atmaka *et al.* (2012) em cérebro e endotélio capilar em cordeiros imunopositivos para *T. gondii*, sinalizando a infecção aguda.

Dagleish *et al.* (2010) identificaram por meio da IHQ em cotilédones, cérebro, músculos esqueléticos, cardíacos e pulmões, casos de toxoplasmose aguda em ovelhas, com marcação positiva para *T. gondii*. A IHQ é um método sensível, mesmo em tecido decomposto que geralmente inviabiliza a aplicação de outras técnicas (Buxton, 1998). Além disso, a histopatologia não permite a detecção de cistos e taquizoítos de forma precisa, necessitando de testes específicos como IHQ e PCR (Van Maanen *et al.*, 2004).

Silva *et al.* (2013) compararam a IHQ com o MAT (teste de aglutinação modificado), indicando que os animais que apresentaram título de 25 no MAT, apresentaram imunomarcção apenas em coração para *T. gondii*. Já os animais com títulos elevados (3200) apresentaram imunodeteção em fígado, coração e cérebro.

Esses autores sugerem que a IHQ deve ser utilizada no diagnóstico da toxoplasmose em tecidos independente dos níveis de anticorpos no animal.

O fato de a imunomarcagem ter ocorrido no epitélio das vilosidades coriônicas pode ser explicado porque em infecções naturais, o protozoário atravessa a barreira do epitélio para ter acesso a tecidos fetais como cérebro, placenta e retina (Barragan e Sibley, 2002).

Reações discretas na IHQ foram obtidas em 4,4% (1/23), reações moderadas em 60,8% (14/23) e severas em 34,8% (8/23) das amostras de placentas analisadas na IHQ. A predominância de reações moderadas e severas pode indicar que há prejuízo causado pelo protozoário neste órgão conforme demonstrado por Costa *et al.* (2014).

Dubey *et al.* (2002) afirmam que as necroses focais nas vilosidades cotiledonares são decorrentes da degeneração causada pelos taquizoítos nos tecidos, sendo confirmada posteriormente na IHQ. Esta é mais sensível do que a citoquímica convencional (histopatologia) devido à identificação dos antígenos, permitindo a conclusão precisa do diagnóstico. Três animais negativos na sorologia apresentaram placentas com lesões características de *T. gondii* na histopatologia e foram positivas na IHQ, demonstrando que esta técnica foi capaz de identificar tecido fetal infectado por *T. gondii* em cabras falso negativas na sorologia. Este resultado pode ter ocorrido porque as cabras estavam provavelmente na fase inicial de infecção, não havendo resposta imune materna de anticorpos detectável (toxoplasmose hiperaguda). Esta resposta após a infecção oral das cabras com oocistos geralmente é detectada após 30 dias pós-infecção como observado em ovelhas prenhas e não prenhas (Buxton e Finlayson *et al.*, 1986).

Um animal foi positivo no ELISA e exame histopatológico foi negativo na IHQ. Isto também pode ocorrer devido à presença do parasito em outros tecidos ou partes do mesmo tecido não analisado, levando a um resultado falso-negativo na IHQ (Nunes *et al.*, 2015), indicando a necessidade de se coletar vários fragmentos para minimizar este efeito.

As quatro amostras de placentas negativas na IHQ podem estar infectadas com outros patógenos distintos do *T. gondii*, visto que se trata de uma técnica segura e com sensibilidade e especificidade altas de até 100% (Navarro *et al.*, 2009) na detecção *T. gondii* em placenta caprinos.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a imunohistoquímica de tecidos placentários é uma ferramenta eficaz no diagnóstico de toxoplasmose em surtos de aborto em cabras, principalmente quando associada a outras técnicas de diagnóstico como a histopatologia e sorologia.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES (Agência Brasileira de Federal de Apoio e Avaliação da Educação Superior).

## REFERÊNCIAS

ABU-DALBOUH, M.A.; ABABNEH, M.M.; GIADINIS, N.D. *et al.* Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v.44, p.49–54, 2012.

ALVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; COSTAS, E. *et al.* Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet. Res.*, v.34, n.3, p.341–352, 2003.

ATMACA, H.T.; OCAL, N.; BABUR, C. *et al.* Reactivated and clinical *Toxoplasma gondii* infection in young lambs: Clinical, serological and pathological evidences. *Small Ruminant Res.*, v.105, p.335–340, 2012.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, D.L. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.*, v.195, n.12, p.1625–1633, 2002.

BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.*, v.29, p.289–310, 1998.



BUXTON, D.; FINLAYSON, J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J Comp. Pathol.* v.96, p.319-33, 1986.

CALDEIRA, F.H.B.; UBIALI, D.G.; GODOY, I. *et al.* Outbreak of caprine abortion by *Toxoplasma gondii* in Midwest Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.31, n.11, p.933-937, 2011.

CHARLESTON, W.A.G. *Toxoplasma* and other protozoan infections of economic importance in New Zealand. *N. Z. J. Zool.*, v.21, n.1, p.67-81, 1994.

COSTA, R.C.; ORLANDO, D.R.; ABREU, C.C. *et al.* Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. *BMC Veterinary Research*, v.10, n.291, p.1-7, 2014.

DAGLEISH, M.P.; BENAVIDES, J.; CHIANINI, F. Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Res.*, v.92, p.19-35, 2010.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Vet. Clin. Food Anim.*, v.22, p.645-671, 2006.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. *Vet. Parasitol.*, v.163, p.1-14, 2009.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in Goats (*Capra hircus*). In: *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2<sup>nd</sup> ed. Beltsville, Maryland, USA.: CRC Press, Taylor e Francis Group, Boca Raton, FL, USA. p.137-144, 2010.

DUBEY, J.P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.177, n.12, p.1203-1207, 1980.

DUBEY, J.P.; LEWIS, B.; BEAM, K. *et al.* Transplacental toxoplasmosis in a reindeer (*Rangifer tarandus*) fetus. *Vet. Parasitol.*, v.110, p.131–135, 2002.

MASSALA, G.; PORCU, R.; MADAU, L. *et al.* Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia Italy. *Vet. Parasito.*, v.117, p.15-21, 2003.

MOELLER, R.B. Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991–1998). *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.13, p.265–270, 2001.

MOTA, A.C.; VIEIRA, M.I.B.; BONDAN, C. *et al.* Aborto em ovinos associado à toxoplasmose: caracterização sorológica, anátomo-patológica e imunoistoquímica. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.17, n.1, p.204-208, 2008.

MUNDAY, B.L.; MASON, R.W. Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats. *Aust. Vet. J.*, v.55, n.10, p.485-487, 1979.

NAVARRO, J.A.; ORTEGA, N.; BUENDIA, A.J. *et al.* Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples. *Vet. Rec.*, v.165, p.175-178, 2009.

NUNES, A.C.B.T.; SILVA, E.M.V.; OLIVEIRA, J.A. *et al.* Application of different techniques to detect *Toxoplasma gondii* in slaughtered sheep for human consumption. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v.24, n.4, p.416-421, 2015.

PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; PEDROSO, P.M.O. *et al.* Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.4, p.167-171, 2007.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V. *et al.* Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet Parasitol.*, v.121, p.33–43, 2004.

SILVA, A.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; LEITE, B.J.S. *et al.* Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. *Vet. Parasitol.* v.191, p.347– 352, 2013.

UNZAGA, J.M.; MORÉA, G.; BACIGALUPE, D. *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goat abortions from Argentina. *Parasitol. Int.*, v.63, p.865–867, 2014.

VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; SCHARES, G. *et al.* An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet. Parasitol.* v.126, p.351–364, 2004.

WANDERLEY, F.S.; PORTO, W.J.N.; CÂMARA, D.R.C. *et al.* Experimental Vaginal Infection of Goats with Semen Contaminated with the “CPG” Strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, v.99, n.4, p.610–613, 2013.

## 4.2 Artigo 2

### Ultraestrutura de placenta em cabras sem raça definida infectadas experimentalmente por *Neospora caninum*

Placental ultrastructure of goats experimentally infected by  
*Neospora caninum*  
(Formato para periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

**Resumo** - Com o objetivo de descrever as alterações ultraestruturais causadas por *Neospora caninum* em placentas de cabras sem raça definida, foi utilizado o modelo de infecção experimental. Os animais foram inoculados com  $10^6$  taquizoítos/mL, por via endovenosa, e divididos em quatro grupos: G1, com inoculação aos 40 dias de gestação (n=4); GII, animais inoculados aos 90 dias de gestação (n=4); GIII, inoculados aos 120 dias de gestação (n=4), e grupo controle (n=3). Os animais foram monitorados diariamente e acompanhados através de ultrassonografia. Ao sinal de sofrimento embrionário/fetal, as cabras foram eutanasiadas e necropsiadas para a coleta de placentomas que foram avaliados macro e microscopicamente. Os cortes de tecido placentário foram fixados para análise em MET, em que se pôde observar lesões celulares graves como degenerações (GI e GII: 50%), vacuolização celular (GI e GIII: 50%), retração nuclear/degeneração nuclear (GII: 50% e G3: 25%), restos celulares (GII: 100%), presença de *N. caninum* (GI: 25%) e degradação de organelas de células placentárias (GI e GII: 75%). Em conclusão, os achados ultraestruturais apresentados indicam modificações celulares degenerativas acentuadas em placentas de cabras induzidas por *N. caninum*.

**Palavras-chave:** Neosporose, caprinos, microscopia eletrônica, reprodução, morte fetal.

**Abstract** - This study aimed to describe alterations caused by *Neospora caninum* in the ultrastructure of placenta from experimentally infected goats. A total of 15 goat nannies were experimentally infected with  $10^6$  tachyzoites/mL. Animals were distributed in four experimental groups. G1 animals were inoculated at 40 days of gestation (n=4), while G2 animals were inoculated at 90 days (n=4), G3 at 120 days (n=4) and G4 was a control group (n=3). Animals were monitored daily and ultrasound was used to observe gestational progress. When embryo/fetal suffering was identified, goats were euthanized and submitted to necropsy. Placentomas were collected, fixated and stored in glutaraldehyde with 2.5% phosphate buffer under refrigeration. Samples were sent to the Laboratory of Immunopathology Keizo-Asami (LIKA) for post-fixation, dehydration and inclusion in epoxy. Then, samples were sent to the Center of Strategic Technologies of the Northeast (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE), where cuts were performed using a Leica EM UC6® ultramicrotome. Severe cell lesions were observed, such as degeneration (G1=50%), cell vacuolization (50% in G1 and G3), nuclear degeneration/retraction (G2=50% and G3=25%), cell debris (G3=100%), presence of *N. caninum* (G1=25%) and degradation of organelles in placental cells (75% in G1 and G2). In conclusion, the ultrastructural findings presented in this study indicate marked degenerative alterations in placenta cells of the infected goats.  
by *N. caninum*.

**Keywords:** Neosporosis. Caprine. Electronic microscopy. Reproduction. Fetal death.

### Introdução

O *Neospora caninum*, durante muitos anos, foi confundido com *Toxoplasma gondii*, e só diferenciado em 1988 (Dubey et al. 1988, Dubey & Lindsay 1996). Desde essa diferenciação, o *N. caninum* foi identificado em inúmeras espécies causando encefalites e abortos em mamíferos, incluindo cães (Dubey et al. 1988, Bjorkman et al. 1994), bovinos (Thilsted & Dubey 1989, Dubey & Lindsay 1990, Barr et al. 1991), felinos (Dubey & Lindsay 1989, Dubey et al. 1990), ovinos (Dubey & Lindsay 1989, 1990, Dubey et al. 1996) e equinos (Dubey & Porterfield 1990).

Abortos em caprinos associados ao *N. caninum* foram relatados pela primeira vez em rebanhos na Califórnia (Barr et al. 1992), Pensilvânia (Dubey et al. 1992) e Costa Rica (Dubey et al. 1996).

Em ovinos infectados experimentalmente, foram detectados abortos e nascimentos de crias fracas ou cordeiros clinicamente saudáveis (Arranz-Solís et al. 2015) semelhantes aos achados descritos em infecções naturais em bovinos (Gibney et al. 2008, Benavides et al. 2012).

As formas de transmissão da neosporose são a horizontal, através da ingestão de oocistos, e a vertical, por via transplacentária. Esta última pode ocorrer quando a infecção acontece durante a gestação (transmissão transplacentária exógena) ou quando a fêmea é infectada antes da gestação e, durante a prenhez, ocorre a recrudescência do protozoário (transmissão transplacentária endógena) (Williams et al. 2009).

Alguns estudos mais recentes foram realizados visando à identificação de lesões causadas pelo protozoário em tecidos fetais e placenta (Porto et al. 2016) e à caracterização da resposta imune materna e fetal (Porto et al. 2017) em cabras.

Estudos ultraestruturais também foram desenvolvidos, descrevendo o protozoário e sua estrutura interna, organelas e membranas (Dubey & Lindsay 1996) em bezerro (Barr et al. 1991), em cultivo celular (Vonlaufen et al. 2004, Hemphill et al. 2006) e em placenta e tecidos fetais (Gibney et al. 2007).

Visando a fornecer maiores informações sobre lesões celulares causadas pelo *N. caninum* em tecido placentário, foi desenvolvido esse estudo, visto que a maioria das descrições de infecções pelo protozoário foi obtida através de cultivos celulares - o que pode diferir em alguns aspectos de infecções em animais, sejam elas naturais ou experimentais. Nesse contexto, objetivava-se descrever as lesões celulares observadas e compará-las com o grupo controle. Essas lesões levam à insuficiência placentária, podendo culminar com a necrose do órgão e com o aborto.

## **Material e métodos**

A descrição detalhada do local, modelo experimental e inoculação em cabras, foi relatado anteriormente por Porto et al. (2016).

A inoculação das cabras foi realizada por via endovenosa com a concentração de  $10^6$  taquizoítos/mL, cepa NC7 Spain. Esses animais foram agrupados de acordo com o tempo gestacional de inoculação: GI (40 dias de gestação; n=4); GII (90 dias de gestação; n=4), e GIII (120 dias de gestação; n=4). O grupo controle foi composto por 3 animais com a mesma idade gestacional e mantidos sob as mesmas condições que o grupo experimental.

Os animais foram submetidos à eutanásia, conforme protocolo proposto pelo Conceia, quando era identificada morte embrionária ou bradicardia fetal (abaixo de 120 batimentos/minuto) através de monitoramento ultrassonográfico. Durante a realização da necropsia, procedeu-se a avaliação macroscópica das placentas, contagem do número de placentomas, mensuração destes com paquímetro e classificação quanto à proximidade do pedículo do funículo umbilical, bem como comprimento de cordão umbilical e pesagem da placenta.

As amostras das placentomas foram coletadas durante a necropsia e fixadas em glutaraldeído tampão fosfato a 2,5% e armazenadas a 4°C.

As amostras foram transportadas para o LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami), onde foram lavadas com tampão fosfato, pós-fixadas com tetróxido de ósmio, lavadas com tampão de uso, desidratadas com acetona Merck® em concentrações crescentes até 100% e embebidas em resina (Époxy embedding medium kit - Sigma-Aldrich®). Foram, então, transportadas ao CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), onde foram realizados cortes em ultramicrótomos Leica EM UC6®. Cortes semi-finos (350nm) foram corados com azul de toluidina e os ultrafinos (60nm) foram contrastados com uranila e chumbo para determinação da área a ser analisada e para posterior observação em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G<sup>2</sup>®.

O experimento foi desenvolvido com a permissão concedida pela Comissão de Ética no uso de animais/UFAL nº059/2013.

## Resultados

Na análise macroscópica das placentas, foi observado que 38,09% dos animais dos grupos experimentais apresentaram lesões a nível placentário. Desses, 50% dos animais pertenciam ao GIII.

Dentre as lesões observadas na macroscopia, encontram-se: pontos de calcificação em placenta (37,5%); depósitos de fibrina (68,5%), e congestão (37,5%) em placentomas.

Quando comparados os grupos infectados e o controle, pôde-se observar que o número de placentomas foi menor em todos os grupos experimentais, mesmo que a diferença estatística tenha sido perceptível apenas no grupo I (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Análise macroscópica da placenta de cabras dos grupos experimentais inoculados com *N. caninum* e controle respectivos: número de placentomas, peso e tamanho de acordo com a proximidade do funículo umbilical (CPC) ou distância (CLC)

Grupo	Placentomas*	Peso**	CPC*	CLC*
G1 (n=7)	107,57±23,21 <sup>B</sup>	142,95±132,31	1,50±0,55	1,17±0,84
Controle (n=3)	151,33±30,17 <sup>A</sup>	60,79±46,66	1,80±0,16	1,14±0,36
G2 (n=7)	123,00±19,49	316,83±81,08	2,96±0,58	2,40±0,54
Controle (n=3)	142,50±0,70	300,90±24,32	3,46±0,75	2,49±1,19
G3** (n=7)	110,1±23,16	322,86±117,89	2,84±1,04	2,16±0,54
Controle (n=3)	145,0±20,66	438,20***	3,46±0,95	2,55±0,89

n= número de animais; \*Teste de t de Student; \*\* Teste de t de Student, entretanto, para o G3 utilizou-se a comparação dos *ranks* médios pelo teste de U Mann-Whitney (distribuição não-normal); \*\*\* Desvio padrão não calculado; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P<0,05$ ) entre o tratamento e controle de um mesmo grupo.

Além disso, os grupos experimentais também foram analisados e comparados com a média do grupo controle como um todo, sem divisão por grupo experimental. Nessa análise, os cotilédones próximos ao funículo umbilical (CPC), dos três grupos, tiveram tamanho menor que o grupo controle.

Em relação ao CPC e ao CLC, as médias de CPC foram maiores, significando que os cotilédones próximos ao funículo umbilical tiveram tamanhos maiores devido à maior necessidade de suprimento sanguíneo (**Tabela 2**).

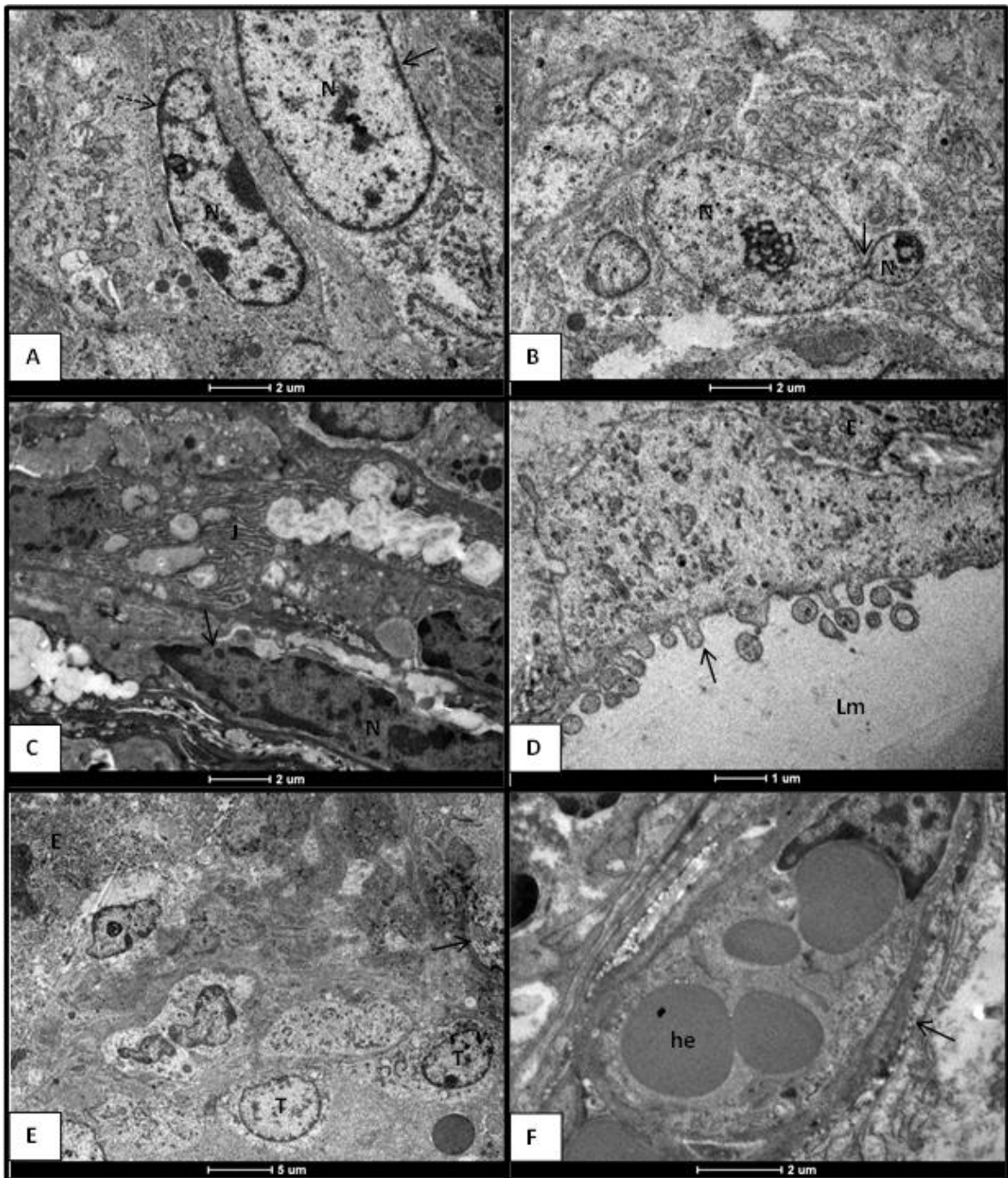
**Tabela 2.** Comparação dos grupos experimentais inoculados com *N. caninum* e controle de placentomas de cabras quanto ao número, peso e proximidade do funículo umbilical

Grupos	Placentomas	Peso	CPC	CLC
G1 (n=7)	107,57±23,21 <sup>B</sup>	142,95±132,31	1,50±0,55 <sup>B</sup>	1,17±0,84 <sup>B</sup>
G2 (n=7)	123,00±19,49 <sup>AB</sup>	316,83±81,08	2,96±0,58 <sup>A</sup>	2,40±0,54 <sup>A</sup>
G3 (n=7)	110,1±23,16 <sup>B</sup>	322,86±117,89	2,84±1,04	2,16±0,54
Controle (n=9)	122,72±25,94 <sup>A</sup>	203,73±167,39	2,49±0,94 <sup>A</sup>	2,00±0,88

n= número de animais; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P<0,05$ ) entre grupos no teste de Tukey.

Além da análise macroscópica das placentas de cabras, foi possível a observação em análises ultraestruturais dos placentomas dos grupos infectados e controle.

No grupo controle, visualizou-se células trofoblásticas e células de epitélio materno, observação das criptas e vilosidades coriônicas e organelas íntegras (**Figuras 1 e 2**).



**Figura 1.** Eletromicrografia de placentas de cabras do grupo controle em diferentes idades gestacionais. A – Fibroblasto (seta pontilhada, (N) núcleo) e trofoblasto (seta, (N) núcleo) em cabra do grupo controle de G1; B – trofoblasto em divisão (seta) em cabra do grupo controle de G1; C – Fibroblasto (seta e núcleo (N)) e junção materno-fetal (J) em placenta de cabra do grupo controle de G2; D – Placenta de grupo controle G2. Observação de epitélio endometrial (E) com vilosidades (seta) se projetando para o lúmen (Lm); E – Epitélio endometrial (E) em junção materno-fetal (seta) com o trofoblasto (T) em cabra do grupo controle de G3; F – Capilar sanguíneo apresentando em seu interior hemácias (he), envoltas pela endotélio vascular (seta).

A junção materno-fetal pode ser observada em áreas de aposição entre os epitélios uterinos e trofoblástico em controle de G1, com visualização de projeções irregulares sobrepostas. Com o desenvolvimento das gestações, foi observado crescimento de interdigitações nessas áreas de junções. É possível a diferenciação de tais áreas pelas características celulares encontradas em cada uma delas.



O epitélio uterino contém ribossomos e grande número de vesículas secretoras em seu citoplasma, além das mitocôndrias terem sido observadas em maior número e tamanho quando comparadas ao epitélio trofoblástico (**Figura 1**).

Já epitélio trofoblástico, consiste em população de células mono, bi ou trinucleadas, mais eletrolucidas em relação ao epitélio materno, com poucos ribossomos em citoplasma, mitocôndrias com formato alongado e bordas celulares formam pequenas criptas. Em regiões de maior contato entre o epitélio uterino e trofoblasto, pôde-se verificar que havia predominância de células trofoblásticas binucleadas.

Nos placentomas bem desenvolvidos do grupo controle em final de gestação (G2 e G3), pôde-se visualizar microvilosidades basais em contato mais íntimo com o epitélio materno do que as microvilosidades apicais. Além disso, os capilares fetais puderam ser visualizados, e sua estrutura compreende uma célula endotelial envolta pela membrana basal do trofoblasto.

Os capilares de origem materna possuíam citoplasma proporcionalmente mais desenvolvido do que os de origem fetal e foi possível também a visualização de trofoblastos nesta região.

A visualização das células e organelas descritas permitiu, também, a identificação das mesmas nos grupos infectados e a percepção de lesões celulares graves.

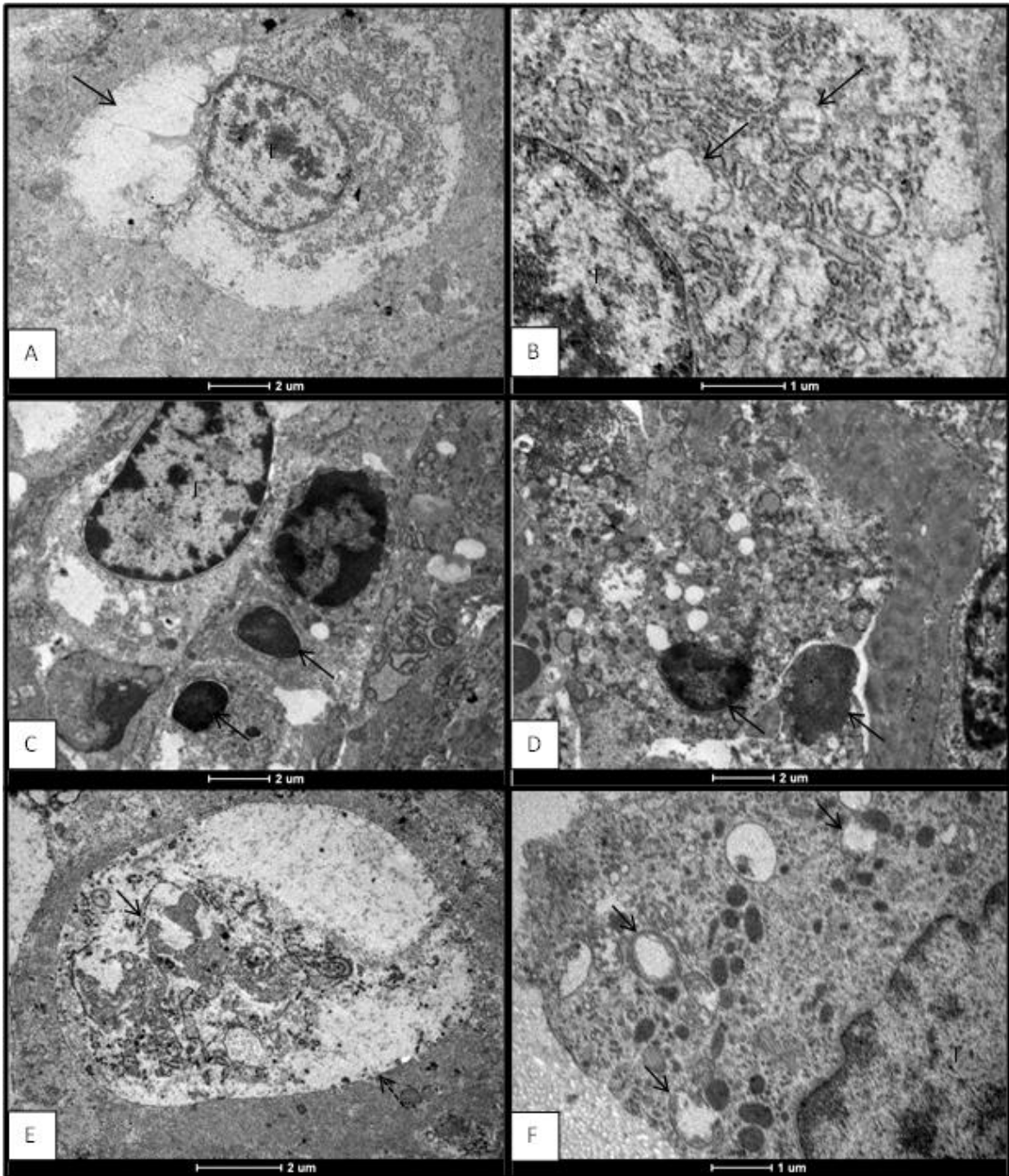
Nos grupos de animais infectados por *N. caninum*, pôde-se observar que as células trofoblásticas possuíam núcleos volumosos e citoplasma repleto de organelas. Devido à intensa lesão celular provocada pelo protozoário, muitas células foram encontradas em degeneração ou com vacuolização citoplasmática.

As células analisadas foram classificadas de acordo com as lesões encontradas em: células em degeneração, com maior predominância no grupo II de 75% das amostras analisadas; vacuolização celular em 50% das amostras dos grupos I e III; retração nuclear e degeneração nuclear em 50% do grupo II e 25% do grupo III; Restos celulares em 100% das amostras do grupo III; Presença do *N. caninum* em 25% das amostras do grupo I. Conforme demonstrado em **tabela 3**.

**Tabela 3.** Lesões celulares encontradas em fibroblastos de placenta de cabras infectadas experimentalmente com *N. caninum*

Lesões celulares	Grupo controle (n=3)	Grupo I (n=4)	Grupo II (n=4)	Grupo III (n=4)
<b>Células em degeneração</b>	1 (33,33%)	2(50%)	3 (75%)	1 (25%)
<b>Vacuolização de células</b>	0 (0%)	2 (50%)	3 (75%)	2 (50%)
<b>Restos celulares</b>	1 (33,33%)	1 (25%)	4 (100%)	2 (50%)
<b>Retração nuclear/degeneração nuclear</b>	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	1 (25%)
<b>Presença de <i>N. caninum</i> no tecido</b>	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Degradação de organelas de células placentárias</b>	2 (66,66%)	3(75%)	3 (75%)	2 (50%)

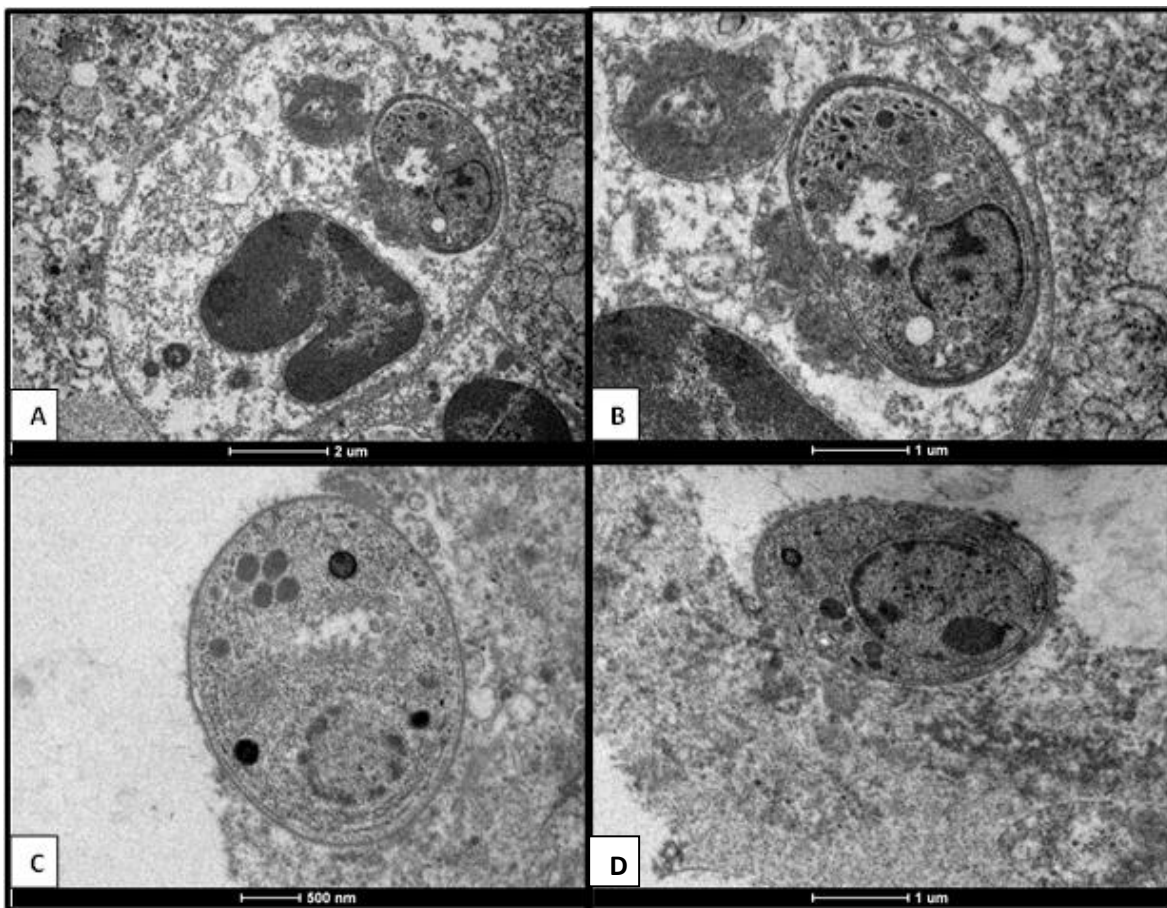
As lesões celulares observadas e descritas anteriormente na tabela 3, causadas pelo protozoário, podem ser observadas (**Figura 2**).



**Figura 2.** Eletromicrografia de placentas de cabras dos grupos infectados por *N. caninum*. A - Trofoblasto (T) apresentando vacuolizações em citoplasma (seta); B - Em aumento maior, mitocôndrias vacuolizadas e sem criptas; C - Visualização de trofoblasto (T), fibroblasto (F) e células em apoptose (setas); D - Em destaque, células em apoptose (seta) e Fibroblasto (F); E - Restos celulares (seta) em citoplasma (seta pontilhada); F - Mitocôndrias de trofoblasto (T) com membranas rompidas.

Durante as análises, foi observado o protozoário no citoplasma de células da decídua ou livre no meio intercelular placentário, em uma das amostras analisadas em eletromicrografia, pertencentes ao G1, que abortaram na terceira semana pós-inoculação.

A membrana do protozoário é identificada como um complexo formado por microtúbulos, limitando o citoplasma. Ainda, pôde-se visualizar um núcleo grande, com nucléolo evidente, micronemas e roptrias responsáveis pela síntese da nova progênie, além de grânulos densos (Figura 3).



**Figura 3.** Eletromicrografia de placenta de cabra de GI infectada experimentalmente por *N. caninum*. A - Taquizoíto de *N. caninum* fagocitado, no citoplasma (limite seta preta) e célula da placentária (seta branca); B e C - Observa-se grânulos densos (Dg), as roptrias (Rho) e núcleo (Nuc) do taquizoíto; D - pode-se visualizar o micronema (Mn) e Núcleo (Nuc) do taquizoíto.

## Discussão

Este é o primeiro estudo descritivo sobre lesões celulares causadas por *N. caninum* em cabras, observadas em microscopia eletrônica.

Nesse trabalho, destacamos a importância da caracterização celular de placentas saudáveis e lesionadas por *N. caninum* a fim de fornecer maiores informações sobre este protozoário e as degradações celulares causadas por ele em placenta de cabras.

Conforme relatado por Porto et al. (2016), os animais que abortaram na 3ª semana pós-infecção (3/3) apresentaram DNA do protozoário em placenta, fato este que foi confirmado com a identificação do parasito na análise ultraestrutural em um dos animais experimentais.

Em outros estudos, no exame ultraestrutural, foram identificados taquizoítos de *N. caninum*, em citoplasma de células epiteliais placentárias degeneradas ou em meio extracelular, em locais adjacentes a áreas com células trofoblásticas lesionadas (Gibney et al. 2008).

Os taquizoítos e bradizoítos de *N. caninum* podem ser diferenciados em nível ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, como ocorre no *T. gondii* (Weiss et al. 1992, Jardine 1996).

No citoplasma de bradizoítos, o núcleo se encontra posicionado posteriormente, há também a presença de mitocôndrias, grânulos de amilopectina, roptrias e micronemas (Barr et al. 1991).

Além disso, em análises de taquizoítos de *N. caninum* realizadas em culturas celulares de fibroblastos, foi constatado que o número de micronemas é variável e que podem se encontrar também de forma perpendicular à membrana (Dubey & Lindsay 1996).

As roptrias foram caracterizadas como material eletrodense e com espessura que pode variar de 2 a 4 vezes em relação ao diâmetro dos micronemas (Dubey & Lindsay 1996).

Neste trabalho não foram visualizados os vacúolos parasitóforos após a invasão da célula hospedeira, como ocorre *in vitro*, onde são perceptíveis os taquizoítos localizados no citoplasma rodeados por vacúolos parasitóforos (Hemphill et al. 2006). Porém, há relatos de que, em infecções *in vivo*, não há a formação de vacúolos parasitóforos (Dubey 2010).

Dentre os processos secretores para a invasão da célula hospedeira, a secreção do micronema ocorre quando os parasitos saem da célula hospedeira (Keller et al. 2004). Porém, um dos parasitos encontrados no interior dessa célula possuía micronemas desenvolvidos, enquanto os outros dois, que foram localizados no meio extracelular, possuem grânulos densos em maior quantidade e sem grande desenvolvimento de micronema.

As proteínas possuem efeito análogo às proteínas de micronema de *T. gondii* e funcionam como complexos proteicos que aderem a, e interagem com, receptores de superfície das células alvo (Carruthers 2002, Dowse & Soldati 2004). Essa secreção de proteínas do micronema foi descrita *in vitro* quando o protozoário foi submetido à incubação a 37°C (Hemphill et al. 2006).

Uma vez no interior da célula hospedeira, *N. caninum* se localiza dentro um vacúolo parasitóforo, formado pela própria membrana celular (Hemphill et al. 2006). Semelhanças também ocorrem ao *T. gondii* no qual o vacúolo parasitóforo resiste a acidificação e maturação do fagolisossoma (Mordue et al. 1999).

As lesões observadas em células placentárias, como degeneração e necrose, ocasionadas pela resposta imune ao parasito, concordam com o que foi descrito por Porto et al. (2016), quando descreveu as alterações placentárias como congestão, edema e depósitos de fibrina nos grupos GI e GII. Assim como, microscopicamente, identificação de placentite necrótica não purulenta multifocal em áreas de vilosidades nos grupos GI, que abortaram na terceira semana, em animal que abortou segunda semana e G2. Lesões semelhantes também foram descritas em ovinos por Arranz-Solís et al. (2015) e Benavides et al. (2012) em vacas infectadas experimentalmente aos 210 dias.

Neste mesmo trabalho de Porto et al. (2016), também encontraram lesões placentárias leves com pequenos pontos necróticos em placentomas, porém, quando analisadas a nível celular, foram encontradas lesões de degeneração e necrose de células trofoblásticas. Este fato pode ter ocorrido por ser a análise em microscopia eletrônica muito mais apurada para avaliação celular, inclusive sendo permitida a avaliação de organelas, do que a histopatologia cuja avaliação confere informações teciduais, não permitindo análises celulares tão específicas.

Achados semelhantes foram descritos também por Gibney et al. (2008) em vacas, que relatou associação entre as lesões celulares encontradas e necroses placentárias causadas pela destruição tecidual acarretada pela presença do protozoário. Ainda, foi possível a observação do parasito nos meios intra e extracelular.

As degenerações encontradas no interior de citoplasma de células trofoblásticas demonstram graves prejuízos no metabolismo celular e, conseqüentemente, na nutrição e manutenção da gestação, principalmente em GI e GII, grupos em que houve abortos.

Lesões graves semelhantes, com deterioração de organelas de células trofoblásticas, como vacuolização de mitocôndrias indicando prejuízo na capacidade de síntese, também foram relatadas por Castejón et al. (2008).

Nas análises macroscópicas das placentas, os achados encontrados nas necropsias de calcificações (37,5%), deposição de fibrina (68,5%) e congestão (37,5%), lesões descritas por Porto et al. (2016).

Na análise morfológica macroscópica das placentas, houve diferença estatística entre todos os grupos experimentais e o grupo controle entre o número de placentomas, e CPC e CLC entre GI e GII. As médias de placentomas apresentadas neste estudo foram maiores que as descritas por Neves et al. (1999) que descreveram média de 103,9±104 cotilédones por gestação. Em relação às médias dos tamanhos dos placentomas, foram menores do que as descritas por Oliveira (2017) em ovelhas: 2,51cm e 2,73cm nos grupos abaixo de 50 dias e acima de 50 dias, respectivamente.

Em relação aos dados ultraestruturais dos grupos controle, a observação da junção materno-fetal com visualização de projeções irregulares sobrepostas, bem como a visualização e caracterização de células uterinas e trofoblásticas, foram descritas também por Lawn et al. (1969).

Em conclusão, os achados ultraestruturais placentários apresentados indicam modificações celulares degenerativas acentuadas, induzidas por *N. caninum*. Este estudo forneceu conhecimento sobre a caracterização de lesões celulares em placentas de cabras, e pode fornecer informações preciosas para estudos posteriores sobre o assunto.

## Referências

- ARRANZ-SOLÍS D., BENAVIDES J., REGIDOR-CERRILLO J., FUERTES M., FERRE I., FERRERAS M.D.C.; COLLANTES-FERNÁNDEZ E., HEMPHILL A., PÉREZ V., ORTEGA-MORA L.M. 2015. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. *Veterinary Research*, 46:19.
- BARR B.C., ANDERSON M.L., WOODS L.W., DUBEY J.P. AND CONRAD P.A. 1992. Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 365-367.
- BENAVIDES J., KATZER F., MALEY S.W., BARTLEY P.M., CANTÓN G., PALAREA-ALBALADEJO J., PURSLOW C., PANG Y., ROCCHI M.S., CHIANINI F., BUXTON D., INNES E.A. 2012. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Veterinary Research*, 43:83.
- BINDER E.M. e KIM K. 2004. Location, location, location: trafficking and function of secreted proteases of *Toxoplasma* and *Plasmodium*. *Traffic*. 5, 914–924.
- BJORKMAN C., LNNDON A., HOLMDABL O.J.M., BARBER J., TREES A.J., UGGLA A. 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol.*, 16: 643-648.
- CARRUTHERS V.B. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*. 81:111–122.
- CASTEJÓN O., LÓPEZ Á.J.; CASTEJÓN O.C. 2008. Cambios ultraestructurales del trofoblasto en los casos de hipoxia durante la preeclampsia. *Rev Obstet Ginecol Venez*, 68(3).
- DOWSE T.J., SOLDATI D. 2004. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Current Opinion in Microbiology*. 7:388–396.
- DUBEY J.P., SCHARES G, ORTEGA-MORA L.M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 20:323–367.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 67:1-59.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S., 1989. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J. Parasitol.*, 75: 765-771.
- DUBEY J.P., PORTERFIELD M.L., 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J.Parasitol.*, 76: 732-734.
- DUBEY J.P., ACLAND H.M., HAMIR A.N. 1992. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. *J. Parasitol.*, 78: 532-534.
- DUBEY J.P., CARPENTER J.L., SPEER C.A., TOPPER M.J., UGGLA A. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 192: 1269-1285.

- DUBEY J.P., HATTEL A.L., LINDSAY D.S., TOPPER M.J., 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 193: 1259-1263.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S., ADAMS D.S., GAY J.M., BASZLER T.V., BLAGBURN B.L., THULLIEZ P. 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.*, 57: 329-336.
- DUBEY J.P., MORALES J.A., VILLAIOS P., LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., TOPPER M.J. 1996. Neosporosis- associated abortion in a dairy goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 208: 263-265.
- GIBNEY E.H., KIPAR A., ROSBOTTOM A., GUY C., SMITH R.F., HETZEL U., TREES A.J., WILLIAMS D.J.L. 2008. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *International journal for parasitology*. 38:579-588. doi: :10.1016/j.ijpara.2007.09.015.
- HEMPHILL A., VONLAUFEN N., NAGULESWARA A. 2006. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 133:261–278. doi:10.1017/S0031182006000485
- JARDINE J. E. 1996. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet. Parasitol.* 62:231–240.
- KELLER N., NAGULESWARAN A., CANNAS A., VONLAUFEN N., BIENZ M., BJORCKMAN C., BOHNE W., HEMPHILL A. 2002. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infection and Immunity*. 70, 3187–3198.
- KELLER N., RIESEN M., NAGULESWARAN A., VONLAUFEN N., STETTLER R., LEEPIN A., WASTLING J. M., HEMPHILL A. 2004. Identification and characterization of a *Neospora caninum* microneme associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. *Infection and Immunity*. 72, 4791–4800.
- KIM K. 2004. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other *Apicomplexa*. *Acta Tropica*. 91, 69–81.
- LOVETT J. L., HOWE D. K., SIBLEY L. D. 2000. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 107, 33–43.
- MORDUE D. G., DESAI N., DUSTIN M., SIBLEY L. D. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *Journal of Experimental Medicine*. 190, 1783–1792.
- NAGULESWARAN A., CANNAS A., KELLER N., VONLAUFEN N., SCHARES G., CONRATHS F. J., BJORCKMAN C., HEMPHILL A. 2001. *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: Secretion, subcellular localization and functional involvement in host cell interaction. *Infection and Immunity*. 69, 6483–6494.
- NAGULESWARAN A., MULLER N., HEMPHILL A. 2003. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. *Experimental Parasitology*. 104, 149–158.
- NISHIKAWA Y., MAKALA L., OTSUKA H., MIKAMI T., NAGASAWA H. 2002. Mechanisms of apoptosis in murine fibroblasts by two intracellular protozoan parasites, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Parasite Immunology*. 24, 347–354.

- NISHIKAWA Y., MISHIMA M., NAGASAWA H., IGARASHI I., FUJISAKI K., OTSUKA H., MIKAMI T. 2001. Interferon gamma induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parasitology*. 123, 25-31.
- OLIVEIRA G.A.A.C. Desenvolvimento placentário em ovelhas mestiças Doppler x santa inês suplementadas nos terços finais de gestação. Dissertação. UNIVERSIDADE Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Fcat Campus de Dracena. 2017. 76f., p.62.
- PORTO W.J.N., REGIDOR-CERRILLO J., KIM P.C.P., BENAVIDES J., SILVA A.C.S., HORCAJO P., OLIVEIRA A.A.F., FERRE I., MOTA R.A., ORTEGA-MORA L.M. 2016. Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. *Vet. Res.* 47 (1):1.
- VONLAUFEN N., GUETG N., NAGULESWARAN A., MÜLLER N., BJÖRKMAN C., SCHARES G., VON BLUMROEDER D., ELLIS J., HEMPHILL A. 2004. In Vitro Induction of *Neospora caninum* Bradyzoites in Vero Cells Reveals Differential Antigen Expression, Localization, and Host-Cell Recognition of Tachyzoites and Bradyzoites. *Infection and immunity*. 72(1):576-583. DOI: 10.1128/IAI.72.1.576-583.2004.
- WEISS L.M.D., LAPLACE H.B., TANOWITZ H.B., WITTNER. 1992. Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 166:213-215.
- WILLIAMS D.J., HARTLEY C.S., BJORKMAN C., TREES A.J. 2009. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136:1895-1900.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram infecções causadas por protozoários podem causar danos graves ao tecido placentário. As células infectadas por *N. caninum* podem apresentar graus variados de lesão dependendo da idade em que ocorra a infecção durante a gestação. Além disso, infecções causadas por *T. gondii* também podem ser decisivas quanto à viabilidade placentária/fetal e o grau de imunodeteção deste protozoário em células placentárias pode ser indicativo da gravidade da infecção.



## 6 REFERÊNCIAS

ABU-DALBOUH, M.A; ABABNEH, M.M.; GIADINIS, N.D.; LAFI, S.Q. Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. *Trop. Anim. Health Prod.*, n. 44, p. 49–54, 2012.

AGUIAR, D.M.; CHIEBAO, D.P.; RODRIGUES, A.A.R.; CAVALCANTE, G.T.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M. Prevalência de anticorpos anti-*neospora caninum* em ovinos do município de monte negro, RO, amazônia ocidental brasileira. *Arq.Inst.Biol.*, v. 71, n. supl., p. 1-749, 2004.

ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. M. B.; MIGLINO, M. A.; MORAIS-PINTO, L. Artérias e veias placentárias em ovinos deslanados sem raça definida (*Ovis aries*, L. 1758). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 37, n. 3, p. 194-199, 2000.

ALVAREZ-GARCÍA, G; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E; COSTAS, E; REBORDOSA, X; ORTEGA-MORA, L. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet. Res.*, v. 34, p. 341–352, 2003.

AMOROSO, E.C. Placentation. In: \_\_\_ PARKES, A.S. *Marshall's physiology os reproduction*. 3ed. Londres: Logmans, Gree., 1952. p. 127-311.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A.. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 2, p.417-431, 2000.

ANDREOTII, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino. *H. Vet.*, v. 122, p. 65-67, 2001.

ARRANZ-SOLÍS, D.; BENAVIDES, JULIO; REGIDOR-CERRILLO, JAVIER; FUERTES, MIGUEL; FERRE, IGNACIO; FERRERAS, MARIA DEL CARMEN; COLLANTES-FERNÁNDEZ, ESTHER; HEMPHILL, ANDREW; PÉREZ, VALENTÍN; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. *Veterinary Research*, v. 46, p. 19, 2015.

ASSIS NETO A.C.; PEREIRA F.T.V.; SANTOS T.C.; AMBROSIO C.E.; LEISER R.; MIGLINO M.A. Evolução morfométrica dos anexos embrionários e fetais bovinos obtidos por monta natural, com 10 a 70 dias da gestação. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 10, p. 859-862, 2009.

ATMACA, H.T.; OCAL, N.; BABUR, C.; KUL, O. Reactivated and clinical *Toxoplasma gondii* infection in young lambs: Clinical, serological and pathological evidences. *Small Ruminant Res.*, v. 105, p. 335– 340, 2012.

BAIRAGI, S.; QUINN, K. E.; CRANE, A.R.; ASHLEY, R. L.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S.; REDDEN, R.R.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REYNOLDS, L.P. Maternal environment and placental vascularization in small ruminants. *Theriogenology*, v. 86, p. 288–305, 2016.

BARBERAN, M.; MARCO, J.C. Patogenia, cuadro clinico y lesional-Toxoplasmosis. *Revista Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina*, n. 52, p. 35-49, 1997.

BJERKAS, I.; PRESTHUS, J. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 97, p. 459-468, 1989.

BARR, B. C. *et al.* Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Veterinary parasitology*. Thousand Oaks, n.1, v. 28, p. 110-116, 1991.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, D.L. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* v. 195, n. 12, p. 1625–1633, 2002.

BARROS, J.C.; NETO, L.F.F.; CUNHA, I.C.; ANDREOTTI, R. Diagnóstico da perda econômica causada pela neosporose na reprodução de novilhas de corte. *Anais... In: 48º Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural, Campo Grande*, 2010.

BASHA, S.; MOHAMMAD, A. G. Some anatomical and histological studies on the placenta of goats in Dhamar, Yemen. *Yemeni Journal of Agriculture & Veterinary Sciences*. v. 1, n. 1, p. 26-32, 2013.

BENAVIDES, J.; KATZER, F.; MALEY, S. W.; BARTLEY, P. M.; CANTÓN, G.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; PURSLOW, C. A.; PANG, Y.; ROCCHI, M. S.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Veterinary Research*, v. 43, n. 83, p. 1-13, 2012.

BITTENCOURT, S. *Microscópio eletrônico de transmissão*. Laboratório de neurofisiologia. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2008.

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

BJERKAS, I.; PRESTHUS, J. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 97, p. 459-468, 1989.

BJORKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 208, p. 1441–1444, 1996.

BJORKMAN, N.; SOLLEN, P.A. Morphology of bovine placenta at normal delivery. *Acta Vet. Scand.*, v. 1, p. 347-362, 1960.

BOREL, N.A.; FREY, C.F.B.; GOTTSTEIN, B.B.; HILBE, M.A.; POSPISCHIL, A.A.; FRANZOSO, F.D.A.; SWALDVOGEL, A. Review: Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *The Veterinary Journal*, v. 200, p. 218–229, 2014.

BUXTON, B. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res*, v. 29, p. 289-310, 1998.

\_\_\_\_\_. Ovine toxoplasmosis: a review. *J. Roy. Soc. Med.*, v. 83, p. 509-511, 1990.

\_\_\_\_\_.; FINLAYSON, J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J. Comp. Pathol.*, v. 96, p. 319-33, 1986.

CALDEIRA, F.H.B.; UBIALI, D.G.; GODOY, I; DUTRA, V.; AGUIAR, D.M.; MELO, A.L.T.; RIET-CORREA, F.; COLODEL, E.M.; PESCADOR, C.A. Outbreak of caprine abortion by *Toxoplasma gondii* in Midwest Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n. 11, p. 933-937, 2011.

CAMPOS, P. P.; VASCONCELOS, A. C.; MELO, M. M. Apoptose no placentomo de cabras gestantes intoxicadas experimentalmente com cipó-preto - *Tetrapterys multiglandulosa*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 56, n. 1, p.9-24, 2004.

CARTER, A. M. Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiol. Rev.*, v. 92, p. 1543–1576, 2012.

CASTAÑO, P.; FUERTES, M.; REGIDOR-CERRILLO, J.; FERRE, I.; FERNANDEZ, M.; FERRERAS, M.C.; MORENO-GANZALO, J.; GONZALEZ-LANZA, C.; PEREIRA-BUENO, J.; KATZER, F.; ORTEGA-MORA, L.M.; PÉREZ, V.; BENAVIDES, J. Experimental ovine toxoplasmosis: influence of the gestational stage on the clinical course, lesion development and parasite distribution. *Vet. Res.*, v. 47, n. 43, p. 1-14, 2016.

CASTRO, E.C.C.; SALGE, A.K.M.; GALDINO, F.J.B.; FERRAZ, M.L.F.; REIS, M.A.; CORRÊA, R.R.M.; TEIXEIRA, V.P.A. Vilosite placentária e sua relação com intercorrências fetais e maternas. *RBGO*, v. 26, n. 10, p. 807-812, 2004.

CAZERTA, S. M. M.; MIGLINO, M. A.; MARQUES, R. S.; VULCANO, M.; PEREIRA, F. T. V. Caracterização das áreas hematófagas da placenta bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 27, n. 6, p. 229-235, 2007.

CHARLESTON, W.A.G. Toxoplasma and other protozoan infections of economic importance in New Zealand. *N. Z. J Zool.*, v. 21, n. 1, p. 67-81, 1994.

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M. M. Aborto Bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 863-868, 2008.

COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.; CASTAGNOLLI, K. C. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. *Semina: Ci. Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 1, p. 61-66, 2001.

COSTA, R.C.; ORLANDO, D.R.; ABREU, C.C.; NAKAGAKI, K.Y.R.; MESQUITA, L.P.; NASCIMENTO, L.C.; SILVA, A.C.; MAIORKA, P.C.; PECONICK, A.P.; RAYMUNDO, D.L.; VARASCHIN, M.S. Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. *BMC Veterinary Research*, v. 10, n. 291, p. 1-7, 2014.

DAGLEISH, M.P.; BENAVIDES, J.; CHIANINI, F. Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Res.*, v. 92, p. 19–35, 2010.

DUBEY, J.P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 177, n.12, p. 1203-1207, 1980.

\_\_\_\_\_. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 910–913, 1988.

\_\_\_\_\_. Congenital neosporosis in a calf. *Vet. Rec.*, v. 125, p 486, 1989.

\_\_\_\_\_. Lesions in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.*, v. 32, n. 2-3, p. 133-144, 1989.

\_\_\_\_\_. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2<sup>a</sup>ed. Boca, Raton: CRC Press, 2009.

\_\_\_\_\_. *Toxoplasmosis in Goats (Capra hircus)*. In: *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2<sup>nd</sup> ed. Beltsville, Maryland, USA.: CRC Press, 2010. p.137-144.

\_\_\_\_\_. *Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years*. *Vet. Parasitol.*, v. 163, p. 1–14, 2009.

\_\_\_\_\_. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals*. In: KRIEGER, J.P. (Ed.). *Parasitic Protozoa*. v.6. Nova Iorque: Academic Press, 1993. p. 1-158.

\_\_\_\_\_. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 214, p. 1160–1163, 1999.

\_\_\_\_\_. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol*, v. 41, p. 1-16, 2003.

\_\_\_\_\_.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 192, p. 1269-1285, 1988.

\_\_\_\_\_.; HARTLEY, W.J.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *J. Parasitol*, v. 76, p. 127–130, 1990.

\_\_\_\_\_.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A.. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 11, p. 267–299, 1998.

\_\_\_\_\_.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol*, v. 141, p. 1–34, 2006.

\_\_\_\_\_.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKÅS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; MCALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol*, v. 32, p. 929–946, 2002.

\_\_\_\_\_.; SREEKUMAR, C.; KNICKMAN, E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; JENKINS, M. C.; LINDSAY, D. S.; GREENE, C. E. Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int. J. Parasitol*, v. 34, p. 157–1167, 2004.

\_\_\_\_\_.; J. L. CARPENTER; C. A. SPEER; M. J. TOPPER; A. UGGLA. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 192, p. 1269–1285, 1888.

\_\_\_\_\_.; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J Vet Diagn Invest*, v. 2, p. 230-233, 1990.

\_\_\_\_\_.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*, v. 67, p. 1-59, 1996.

\_\_\_\_\_.; SCHARES,G; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical microbiology reviews*, v. 20, n.2, p. 323–367, 2007.

\_\_\_\_\_.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—the last five years. *Vet. Parasitol*, v. 180, n. 1, p. 90–108, 2011.

\_\_\_\_\_.; BUXTON, D.; WOUDA,W. The pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.*, v. 134, p. 267–289, 2006.

\_\_\_\_\_.; CARPENTER, J.L. Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats 100 cases (1952–1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 203, p. 1556–1566, 1993.

\_\_\_\_\_.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 192, p. 1269–1285, 1988.

\_\_\_\_\_.; KOESTNER, A.; PIPER, R.C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 197, p. 857–860, 1990.

\_\_\_\_\_.; LEWIS, B.; BEAM, K.; ABBITT, B. Transplacental toxoplasmosis in a reindeer (*Rangifer tarandus*) fetus. *Vet. Parasitol*, v. 110, p. 131–135, 2002.

\_\_\_\_\_.; LINDSAY, D.S. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Vet. Clin. Food. Anim.* v. 22, p. 645–671, 2006.

\_\_\_\_\_.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 140, p. 1–34, 2006.

\_\_\_\_\_.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, Abr. 2007, p. 323–367, 2007.

\_\_\_\_\_.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. *Veterinary Parasitology*, v. 180, p. 90–108, 2011.

ENDERS, A. C. Reasons for diversity of placental structure. *Placenta*, v. 30, n. Suppl A, S15–S18, 2009.

FIGLIUOLO, L.P.C. Prevalência de anticorpos *anti-Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) e *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988) em ovinos e caprinos do estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. São Paulo: USP, 2003. 90p.

FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.O.; COSTA, I.N.; GOMES, A.O.; SILVA, A.L.N.; PENA, J.D.O.; MÍNEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Evaluation of vertical transmission of

*Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. *Placenta*, v. 32, p. 116-120, 2011.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, v. 167, p. 893–896, 1970.

GIBNEY, E. H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; HETZEL, U.; TREES, A. J.; WILLIAMS, D.J.L. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *International journal for parasitology*, v.38, p. 579-588, 2008.

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

GRAZUL-BILSKA A.T.; BOROWICZ, P.P.; JOHNSON, M.L.; MINTEN, M.A.; BILSKI, J.J.; WROBLEWSKI, R. et al. Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction*, v. 140, p. 165–74, 2010.

GROSS, U., W. BOHNE, M. SOE<sup>^</sup>TE, AND J. F. DUBREMETZ. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today*, v. 12, p. 30–33, 1996.

GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, v. 49, p. 39-51, 1995.

GUY, C. S.; WILLIAMS, D. J. L.; KELLEY, D. F.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; BJORKMAN, C.; SMITH, R. F.; TREES, A. J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Veterinary Record*, v. 149, p. 443–449, 2001.

HAFEZ, S. The placentome in the buffalo. *Acta zoologie*, v. 35, n. 1-2, p. 177-191, 1954.

HÄSSIG, M.; SAGER, H.; REITT, K.; ZIEGLER, D.; STRABEL, D.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* in sheep: A herd case report. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p. 213– 220, 2003.

HOWE, L.; WEST, D. M.; COLLETT, M. G.; TATTERSFIELD, G.; PATTISON, R. S.; POMROY, W. E.; KENYON, P. R.; MORRIS, S. T.; WILLIAMSON, N. B. The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Rumin Res*, v. 75, p. 115-122, 2008.

IGWEBUIKE, U. M. A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 112, p. 1-7, 2009.

- IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placenta: a minireview. *Animal Reproduction Science*, v. 93, n. 3–4, p. 185-198, 2006.
- INNES, E.A.; BARTLEY, P.M.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.E.; BUXTON, D. Comparative host–parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine*, v. 25, p. 5495–5503, 2007.
- JARDINE, J. E. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet. Parasitol.*, v. 62, p. 231–240, 1996.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Cap. 22. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 445-446.
- KAREN, A.; SZABADOS, K.; REICZIGEL, J.; BECKERS, F.J.; SZENCI, O. Accuracy of transrectal ultrasonography for determination of pregnancy in sheep: effect of fasting and handling of the animals. *Theriogenology*, v. 61, p. 1291- 1298, 2004.
- KING, G.J.; ATKINSON, B. A. The bovine intercaruncular placenta throughout gestation. *Ani. Reprod. Sci.*, v.12, p. 241-254, 1987.
- KLISCH, K.P.; FARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R.; (1999). Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. *Anat. Embryol.*, v. 200, p. 229 –237, 1999.
- LACERDA, P.M.O. *Aspectos estereológicos dos vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados*. Dissertação de Mestrado. São Paulo: USP, 2006.
- LAUN, A.M.; CHIQUOINE, A.D.; AMOROSO, E.C. The development of the placenta in the sheep and goat: an electron microscope study. *J. Anat.*, v. 105, n. 3, p. 557-578, 1969.
- LEE, C. S.; WOODING, F. B. P.; BRANDON, M. R. Immunogold co-localisation of ovine placental lactogen and the antigen recognised by the SBU-3 monoclonal antibody in sheep placental granules. *J. Reprod. Fertil.*, v. 78, p. 653-662, 1986.
- LIN, M.H.; CHEN, T.C.; KUO, T.T.; TSENG, C.C.; TSENG, C.P. Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 11, p. 4121-4125, 2000.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, v. 82, p. 327–333, 1999.
- LIU, Z.; LI, J.; PAN, H. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in small ruminants in China. *Prev. Vet. Med.*, v. 118, n. 4, p. 488–492, 2015.



MAJEED, A. F.; SHALAL, M. S.; MOHAMMED, T. R. Histology of ovine placenta during gestation periods. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*. v. 1, n. 3, p. 138-147, 2012.

MARTINS, N.É.X.; FRESCHI, C.R.; BAPTISTA, F.; ZACARIAS, R.M.; FREITAS, F.L.C.; ALMEIDA, K.S. Ocorrência de Anticorpos anti-*Neospora caninum* em Vacas Lactantes no Município de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. v. 40, n. 3, p. 231-238, jul.-set., 2011.

MARQUES, R. S.; VULCANO, M.; CAZERTA, S. M.M.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, S. T. V. Caracterização morfológica da região intercaruncular uterina de vacas e búfalas gestantes. *Biotemas*, v. 20, n. 3, p. 103-114, 2007.

MASSALA, G.; PORCU, R.; MADAU, L.; TANDA, A.; IBBA, B.; SATTA, G.; TOLA, S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia Italy. *Vet Parasitol*, v. 117, p.15-21, 2003.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.*, v. 28, p. 1473-1478, 1998.

MCARDLE, H. J.; DANZEISEN,R.; FOSSET, C.; GAMBLIN, G. L. The role of the placenta in iron transfer from mother to fetus and the relationship between iron status and fetal outcome. *BioMetals*, v. 16, p. 161-167, 2003.

MODOLO, J. R.; STACCHISSINI, A. V. M.; GENNARI, S. M.;DUBEY, J.P.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; BARROZO, L. V.; LEITE, B. L. S. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 28, n. 12, p. 597-600, 2008.

MOELLER, R.B. Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991–1998). *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 13, p. 265–270, 2001.

MOEN, A.R.; WOUDA, W.; MUL, M.F. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: A retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*, v. 49, p. 1301-1309, 1998.

MOTA, A.C.; VIEIRA, M.I.B.; BONDAN, C.; EDELWEISS, M.I.A.; DAMETTO, M.A.; GOMES, A. Aborto em ovinos associado à toxoplasmose: caracterização sorológica, anátomo-patológica e imunoistoquímica. *Rev Bras Parasitol Vet.*, v. 17, n. 1, p. 204-208, 2008.

MUNDAY, B.L.; MASON, R.W. Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats. *Aust Vet J.*, v. 55, n. 10, p. 485-487, 1979.

NAKAGAKI, K. Y. R.; ABREU, C. C.; COSTA, R. C.; ORLANDO, D. R.; FREIRE,L.R.; BRUHN, F. R. P.; PECONICK,A. P.; WOUTERS, F.;WOUTERS, A. T. B.; (2016). Lesions and distribution of *Neospora caninum* in tissues of naturally infected female goats. *Small ruminant research*, v. 140, p. 57-62, 2016.

NAVARRO, J.A.; ORTEGA, N.; BUENDIA, A.J.; GALLEGO, M.C.; MARTÍNEZ, C.M.; CARO, M.R.; SÁNCHEZ, J.; SALINAS, J. Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples. *Vet Rec*, v. 165, p. 175-178, 2009.

NEGRÃO, C.B. A importância do *Neospora caninum* na reprodução de bovinos. Dissertação de Mestrado. São Paulo: UNESP, 2006. 31p.

NEVES, W. C.; MIGLINO, M. A.; ARRIVABENE, M.; CAVALCANTE FILHO, M. F.; FEITOSA Jr, F. S. Dados anatômicos da placenta em caprinos estudado por injeção intravascular de neoprene. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 36, n. 1, p. 9-14, 1999.

NODEN, D.M.; DE LAHUNTA, A. Embriologia de los animais domésticos. Espanha: Acribia, 1999. 399p.

NUNES, A. C. B. T.; SILVA, E. M. V.; OLIVEIRA, J. A.; YAMASAKI, E. M.; KIM, P. P.; ALMEIDA, J. C.; NUNES, K. B.; MOTA, R. A. Application of different techniques to detect *Toxoplasma gondii* in slaughtered sheep for human consumption. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, v. 24, n. 4, p. 416-421, 2015.

NUNES, J.E.S.; VASCONCELOS, A.C.; MARTINS, E. *et al.* Maturação e liberação placentária em bovinos e sua relação com apoptose. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 25, p. 513-525, 2001.

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, A. B.; RAMOS, E. M.; CAVALCANTE, T. V.; MARUO, V. M. Caracterização histológica da placenta de zebuínos criados na Amazônia oriental. *Acta Veterinária Brasilica*, v. 4, n. 2, p. 100-104, 2010.

ORLANDO, D. R.; COSTA, R. C.; SOARES, B. A.; OLIVEIRA, N. S. C.; NASCIMENTO, L. C.; PECONICK, A. P.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais. *Pesq. vet. Bras.*, v. 33, n. 11, p. 1332-1338, 2013.

OTERO, A.R.S.; UZÊDA, R.S.; JUNQUILLO, A.B.; SALES, T.S.; JESUS, E.E.V.; SILVA, V.M.G.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O. Antígenos de taquizoítos da cepa NC-Bahia de *Neospora caninum* reconhecidos por anticorpos IgG de ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5., 2003, Salvador, BA. *Anais...* Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003, p.58.

PAZINATO F.M.; CURCIO B.R.; FERNANDES C.G.; FEIJÓ L.S.; SCHMITH R.A.; NOGUEIRA C.E.W. Histological features of the placenta and their relation to the gross and data from Thoroughbred mares. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 36, n. 7, p. 665-670, 2016.

PEREIRA, M. F.; MOTA, R. A.; PEIXOTO, R.M.; PIATTI, R.M. Estudo de casos de aborto em caprinos e ovinos no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciênc. vet. tróp.*, Recife-PE, v. 16, n. 1/2/3, p. 18 - 30, 2013.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L.M.;

Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, v. 121, p. 33-43, 2004.

PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; PEDROSO, P.M.O.; BANDARRA, P.M.; OKUDA, L.H.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras*, v. 27, n. 4, p. 167-171, 2007.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.

PINTO, L. M.; AMBRÓSIO, C. E.; TEIXEIRA, D. G.; ARAÚJO, K. P. C.; KFOURY JÚNIOR, J. R.; MORINI JÚNIOR, J. C.; MORINI, A. C.; RICI, R. E. G.; FERREIRA, G. J. B. C.; MARTINS, D. S.; MIGLINO, M. A. Comportamento das células trofoblásticas gigantes na placenta de vacas Nelore (*Bos indicus* – Linnaeus, 1758). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p. 110-121, 2008.

PORTO, W. J. N.; REGIDOR-CERRILLO, J.; KIM, P. C. P.; BENAVIDES, J.; SILVA, A. C. S.; HORCAJO, P.; OLIVEIRA, A. A. F.; FERRE, I.; MOTA, R. A.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. *Vet Res*, v. 47, p. 29, 2016.

PORTO, W. J. N.; HORCAJO, P.; KIM, P. C. P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ROMÃO, E. A.; Álvarez-García, G. MESQUITA, E. P.; MOTA, R. A.; ORTEGA-MORA, L. M.; (2017). Peripheral and placental immune responses in goats after primoinfection with *Neospora caninum* at early, mid and late gestation. *Veterinary Parasitology*, v. 242, p. 38-43, 2017.

Prefeitura de Coité do Nóia. Disponível em: <http://www.coitedonoia.al.gov.br/126/DadosMunicipais/>, acesso 22/10/16.

RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SILVIO L.P. SOUZA, S. L. P.; DENISE P. BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*neosporea caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S.; VONNAHME, K.A.; LUTHER, J.S.; BUCHANAN, D.S; *et al.* Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol.*, v. 54, p. 355–66, 2010.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; PALMIERI, C.; GRAZUL-BILSKA, A. T. Placental vascular defects in compromised pregnancies: effects of assisted reproductive technologies and other maternal stressors. *Adv Exp Med Biol.*, v. 814, p. 193–204, 2014.

REYNOLDS, L. P.; VONNAHME, K. A.; LEMLEY, C. O.; REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; BOROWICZ, P.P. *et al.* Maternal stress and placental vascular function and remodeling. *Curr Vasc Pharmacol.*, v. 11, p. 564–93, 2013.

ROA, I.; SMOK, S. C.; PRIETO, G. R. Ê. Placenta; anatomia e histologia comparada. *Int. J. Morphol.*, v. 30, n. 4, p. 1490-1496, 2012.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SANTOS, R. L.; BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JR. A. P.; ANDRADE, J. S. Volumetric proportions of the goat placenta structural components throughout gestation. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 156-160, 1998.

SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.Y.; CANAVESSI, A.M.O.; PINCKNEY, R.D. Ocorrência de Anticorpos de i em vacas leiteiras avaliadas pelos métodos de ELISA e RIFI, no Município de Avaré, São Paulo. *Semina Ciênc Agrar.*, v. 24, p. 3-10, 2003.

SILVA, A. V.; CUTOLO, A. A.; LANGONI, H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 7-11, 2002.

SCHOENAU, L. S. F.; PINTO, L. M.; PEREIRA, F. T. V.; SHOENAU, W.; MIGLINO, M. A. Aspectos anatômicos da macro e microvascularização da placenta em ovinos (*Ovis aries*). *Braz J vet Res anim Sci*, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 405-413, 2005.

SKINNER, H. A. *The origin of medical terms*. 2ªed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1961. 328p.

SILVA, A.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; LEITE, B.J.S.; MELLOC, M.F.V.; BRANDÃO, F.Z.; LEITE, R.I.J.C.K.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; LILENBAUM, W.; FONSECA, A.B.M.; FERREIRA, A.M.R. Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. *Vet Parasitol.*, v. 191, p. 347-352, 2013.

SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J. Protozool.*, v. 36, p. 458-463, 1989.

STAUNTON, M.J.; GAFFNEY, E.F. Apoptosis. Basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 122, p. 310-319, 1998.

SUGUNA, K.; MEHROTRA, S. K.; SINGH, S. K.; SHANKER, U.; SARATH, T. Early pregnancy diagnosis and embryonic and fetal development using real time B mode ultrasound in goats. *Small Rum. Res.*, v. 80, p. 80-86, 2008.

TOMAVO, S., B. FORTIER, M. SOETE, C. ANSEL, D. CAMUS, AND J. F. DUBREMETZ. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, v. 59, p. 3750-3753, 1991.

UNZAGA, J.M.; MORÉA, G.; BACIGALUPE, D.; RAMBEAUD, M.; PARDINI, L.; DELLARUPE, A.; DE FELICE, L.; GOS, M.L.; VENTURINI, M.C. *Toxoplasma*

*gondii* and *Neospora caninum* infections in goat abortions from Argentina. *Parasitol Int.*, v. 63, p. 865–867, 2014.

VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; SCHARES, G.; VON BLUMRODER, D.; CONRATHS, F.J.; NORTON, R.; WILLIAMS, D.J.L.; ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E.A.; MATTSSON, J.G.; BJORKMAN, C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L.M.; MULLER, N.; SAGER, H.; HEMPHILL, A. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet. Parasitol.*, v. 126, p. 351–364, 2004.

WANDERLEY, F.S.; PORTO, W.J.N.; CÂMARA, D.R.C.; CRUZ, N.L.N.; FEITOSA, B.C.O.; FREIRE, R.L.; MORAES, E.P.B.X.; MOTA, R.A. Experimental Vaginal Infection of Goats with Semen Contaminated with the “CPG” Strain of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*, v. 99, n. 4, p. 610–613, 2013.

WATHES, D. C.; WOODING, F. B. P. Na eletron microscopic study of implantation in the cow. *Am. J. Anat.*, v. 159, p. 285-306, 1981.

WEISS, L. M., D. LAPLACE, P. M. TAKVORIAN, A. CALLI, H. B. TANOWITZ, AND M. WITTNER. Development of bradyzoites of *Toxoplasma gondii* in vitro. *J. Eukaryot. Microbiol.*, v. 41, p. 18S, 1994.

WILLIAMS, D.J.; HARTLEY, C.S.; BJORKMAN, C.; TREES, A.J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology*, v. 136, p. 1895–1900, 2009.

WINSATT, W. A. Observations on the porphogenesis, cytochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am. J. Anat.*, v. 159, p. 209-243, 1980.

WOODDING, F. B. P. Current topic: the sinepiteliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, v.13, p. 101-113, 1992.

## ANEXOS

### Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino pela Comissão de ética no uso de animais - CEUA



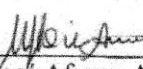
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

#### Comissão de ética no uso de animais - CEUA

#### Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	122/2015
Número do processo	23082.021956/2015
Data de emissão da licença	09 de Novembro de 2015
Título do Projeto	Avaliação da dinâmica da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em caprinos naturalmente infectados .
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota .
Colaboradores	Júnior Mário Baltazar de Oliveira ; Pomy de Cássia Peixoto Kim; Jonatas Campos de Almeida; Andrea Alice da Fonseca Oliveira; José Wilton Pinheiro Júnior; Wagner José Nascimento Porto; Emanuela Polimeni de Mesquita; Bruno Pajeú e Silva; Grasiene de Meneses Silva; Renata Pimentel Bandeira de Melo; Camila de Moraes Pedrosa; Jonas de Melo Borges; Ana Clécia dos Santos Silva; Viviane Melo Coelho Barros; Walter Franklin Bernardino Leão Filho.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Camundongo heterogênico; 59 (machos e fêmeas); Caprino 877 (machos e fêmeas); total de 936 animais.

  
Prof.ª Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim  
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof.ª Dra. Marleyne Amorim  
Coordenadora CEUA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**Projeto n. 059/2013**

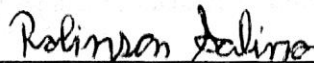
**TÍTULO:** Neosporose em caprinos: dinâmica e repercussões da infecção natural e reprodução experimental da enfermidade

**RESPONSÁVEL:** Rinaldo Aparecido Mota

**OBJETIVO:** Avaliar a dinâmica da infecção por *N. caninum* em caprinos mediante o acompanhamento de duas fazendas durante um período de um ano.

**SITUAÇÃO:** Aprovado

Maceió, 11 de outubro de 2013.



---

Robinson Sabino da Silva

Coordenador da CEUA/UFAL

**Robinson Sabino da Silva**  
Coordenador da CEUA-UFAL  
Comissão de Ética no Uso de Animais




Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

**Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino**

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto descrito abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

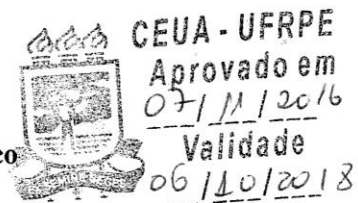
Número da licença	137/2014
Número do processo	23082.023371/2014
Data de emissão da licença	03 de Novembro de 2014
Título do Projeto	Macro e microvascularização placentária em caprinos infectados experimentalmente por Neospora caninum.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
Colaboradores	Rinaldo Aparecido Mota; Emanuela Polimeni de Mesquita.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Caprino; total de 45 animais.

  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Monteiro Tenório  
(Vice-Presidente da CEUA-UFRPE)





**Universidade Federal Rural de Pernambuco**  
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



**Comissão de ética no uso de animais - CEUA**

**Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino**

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto descrito abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	119/2016
Número do processo	23082.020454/2016-13
Data de emissão da licença	07 de novembro de 2016
Título do Projeto	Macro e microvascularização placentária em caprinos infectados experimentalmente por Neospora caninum
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
Colaboradores	Rinaldo Aparecido Mota; Emanuela Polimeni de Mesquita
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Caprino: 45 Fêmeas

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná  
(Vice- Coordenador da CEUA-UFRPE)

## **Política Editorial**

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

## **Reprodução de artigos publicados**

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz)

## **Orientações Gerais**

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.  
**Leia "PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE**
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.

## **Comitê de Ética**

**É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Committee" (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.**

#### **Tipos de artigos aceitos para publicação** **Artigo científico**

**completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.**

**Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.**

**O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.**

**O número de Referências não deve exceder a 30.**

#### **Preparação dos textos para publicação**

**Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.**

#### **Formatação do texto**

**O texto NÃO deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.**

**Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.**

#### **Seções de um artigo**

**Título:** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

**Autores e Filiação:** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

**Resumo e Abstract:** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa. **Palavras-chave e Keywords:** No máximo cinco e no mínimo duas\*. \* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

**Introdução:** Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

**Material e Métodos:** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética). **Resultados:** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados. *Tabela*. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação. *Figura*. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação. **Discussão:** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes). **Conclusões:** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

**Agradecimentos:** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

**Referências:** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ.

## Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.
- Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.
- **OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br) comunicando tal necessidade. SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS**
- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

## Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item "Justification" (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).

## **Normas de submissão Revista Pesquisa Veterinária Brasileira - Artigo 2**

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são avaliados pelos pares (peer review) e, aceitos para publicação, com dois pareceres favoráveis ou rejeitados, por dois pareceres desfavoráveis

Os direitos autorais dos artigos aceitos para publicação permanecem com os autores.

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da comunicação de aceite, ao autor para correspondência. Não há taxa de submissão e avaliação de artigo.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

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

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;

c) o ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o RESUMO deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

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

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos

(=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

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

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

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

a) A digitação deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada em caixa alta e baixa, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto). 5. Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. Não há traços verticais, nem fundos cinzas. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.