

## ESTUDO MOLECULAR RETROSPECTIVO DE *Neospora caninum*

Sthefany Patareli<sup>1</sup>; Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo<sup>2</sup>; Vitor Barbosa Fialho Martins<sup>1</sup>; Karlos Henrique Martins Kalks<sup>3</sup>; Gabriel Domingos Carvalho<sup>3,4</sup>; Ana Paula Peconink<sup>3</sup>

**Resumo:** *Neospora caninum* é protozoário de grande importância na medicina veterinária, por infectar várias espécies e causar prejuízos em várias delas, sendo os bovinos a que apresenta maior importância econômica. Amostras de DNA foram obtidas de tecidos nervosos conservados em parafina do ano de 1979 a 1989, que foram submetidas à PCR para tentativa do diagnóstico nessas datas. Nenhuma amostra investigada foi positiva no teste; contudo, a eficiência da metodologia empregada favorece a estudos posteriores.

**Palavras-chave:** diagnóstico; extração de DNA; *Neospora caninum*; PCR.

### Introdução

*Neospora caninum* é um protozoário do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, que foi descrito primeiramente em 1984, por Bjerkas *et al.* (1984), em cães e bezerros com encefalomielite. Porém, somente em 1988, esse protozoário foi isolado e nomeado por Dubey *et al.* (1988). *N. caninum* é um parasito morfológicamente semelhante ao *Toxoplasma gondii*, diferindo desse pela imunogenicidade e patogenicidade (DUBEY, 2003).

McAllister *et al.* (1998) e Gondim *et al.* (2004), respectivamente, demonstraram experimentalmente que cães e coiotes são hospedeiros definitivos do *N. caninum*. Porém, o parasito infecta várias espécies animais e pode causar doença em várias delas. Evidências de infecções naturais foram descritas em várias espécies, sendo em bovinos a de maior importância pelas perdas financeiras. Dentre os prejuízos causa-

---

<sup>1</sup> Acadêmico(a) de Med. Veterinária da FACISA – e-mail: tefhe@hotmail.com;

<sup>2</sup> Professor Titular DVT/UFV e-mail: jpatarro@ufv.br; <sup>3</sup> Pós-graduando DVT/UFV;

<sup>4</sup> Professor da FACISA - e-mail: gabriel@univicoso.com.br

dos por esse protozoário, podem ser citados os abortamentos, a proporção de vacas descartadas, a reposição de novos animais no rebanho, a queda na produção leiteira, que pode chegar a 1kg/dia, bem como na produção de gordura no leite (HERNANDEZ *et al.*, 2001).

Há duas formas de transmissão, horizontal e vertical, sendo a primeira por meio da ingestão de oocistos esporulados e tecidos contendo cistos; e, a segunda, por via transplacentária (TREES *et al.*, 1999). Segundo Dubey *et al.* (2007), as medidas de controle do *N. caninum* limitam-se basicamente em evitar que os cães contaminem o alimento e água dos bovinos e se alimentem da placenta bovina.

O diagnóstico exato dessa doença é fundamental para a execução de medidas eficazes de controle. Dentre o método de diagnóstico, destacam-se os *ante mortem*, bem como as técnicas de imunofluorescência indireta, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), *Western Blotting* e PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Somado a essas, porém de forma subjetiva, pode-se comentar dos sinais clínicos em bovinos como abortamentos, que, segundo Lindsay *et al.* (1996), ocorrem entre o terceiro e o oitavo mês de gestação. Há também as técnicas empregadas no diagnóstico *pos mortem* como histopatologia e imuno-histoquímica.

Visto a importância desse protozoário, o objetivo deste trabalho foi o de tentar diagnosticar, por meio de técnicas de biologia molecular, a neosporose, utilizando material conservado em parafina, datado de 1978 a 1989, no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT-UFV).

## Material e Métodos

O experimento realizou-se no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoário e Vetores (LBCHV-BIOAGRO/UFV). As amostras de DNA foram extraídas de tecidos nervosos de cães, conservadas em blocos embebidos em parafina, no Laboratório de Histopatologia/DVT-UFV. Foram utilizadas amostras anteriores ao ano de 1989 e posteriores de 1978. Como controle positivo, foi extraído DNA de uma amostra sabidamente positiva, gentilmente cedida pelo professor Luiz Fernando Pita Gondim, da Universidade Federal da Bahia, e como controle negativo, 2 µL de água no lugar do DNA.

Primeiramente, os blocos foram cortados em fatias de 5 a 20 mg e colocados separadamente em microtubos. Após esse passo, adicionou-se solução de Tween 20 (0,5% de tween 20, 1 mM EDTA, 50 mM tris-HCL, pH 8,5), sendo posteriormente colocados a 95 °C, por dez minutos, e a 65 °C, pelo mesmo tempo. Adicionou-se solução de proteinase K e *buffer* T1, providos pelo kit comercial *Genomic DNA from Tissue-Machery-Nagel*, e incubados a 65 °C em banho-maria por 12 horas. Passado esse período, as amostras foram retiradas do banho-maria e centrifugadas a 14.000 rpm por cinco minutos a 0 °C. Após centrifugadas, a 14.000 rpm, a 4 °C, adicionou-se uma segunda solução de proteinase K (20 mg/mL) e incubaram-se as amostras a 65 °C, por uma hora. Foi coletado o sobrenadante e prosseguiu-se, a partir do passo 3, do manual do kit comercial já descrito.

Para as reações, um par de *primers* direto (5'TGTGCATATATCCGGGAG TG3') e reverso (5' CTTCCCTCAAACGCTATCCA3'), flanqueadores de uma região de 154 pares de base, foi desenhado, a partir da sequência de *N. caninum* linhagem NC-Bahia, depositada no GenBank™ (AY259043).

As reações foram realizadas com temperatura inicial de desnaturação de 94 °C, por um minuto, seguidas de 30 ciclos de 94 °C, por 20 segundos; 58 °C por 45 segundos; e 72 °C, por 45 segundos para extensão das fitas pela Go® *Taq* DNA polimerase (Promega). Ao final dos ciclos, foi realizada uma extensão final de sete minutos a 72 °C.

Após a amplificação, aplicou-se gel de agarose 1% nas amostras, que foram submetidas à corrida eletroforética em cuba, tendo TBE (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M) como tampão. Posteriormente, foram coradas com brometo de etídeo. Para a análise dos géis, foi utilizado padrão de peso molecular *DNA Ladder 100pb* (Promega).

## Resultados e Discussão

A avaliação da extração de DNA demonstrou que a técnica foi realizada de modo eficiente (Tabela 1), pois excelentes concentrações de DNA foram obtidas, confirmando resultados semelhantes obtidos por Santos *et al.* (2008). As extrações apresentaram um arraste na quantificação pela corrida eletroforética, em razão do processamento que essas

Tabela 1 – Quantificação por espectrofotometria

Amostra/Ano	Concentração de DNA (mg/mL)	Amostra/Ano	Concentração de DNA (mg/mL)
Controle positivo	377,5309	1989	229,0399
1979	273,7435	1982	40,6979
1978	81,4406	1981	99,0604
1983	107,7720	1980	74,7325
1986	142,3935	1988	278,6850
1988	1097,373	-	-

amostras sofreram para serem incluídas em parafina, também verificada pelo mesmo autor. Esse fato ocorreu mesmo quando a análise por espectrofotometria se apresentou satisfatória (Tabela 1). A extração do controle positivo também obteve excelente concentração, provando que os testes realizados funcionaram.

As amostras estudadas apareceram negativas na PCR (Figura 1), corroborando com os resultados de Bjerkas *et al.* (1984), pois nenhuma amostra amplificou na PCR. Sendo assim, o primeiro diagnóstico ainda é confirmado para aquela data; porém, estudos posteriores ainda podem vir a demonstrar o contrário, principalmente se for investigada maior quantidade de amostras. O controle positivo comprovou a eficiência da técnica e negatividade das amostras, pois nele amplificou-se a região de interesse, um fragmento de aproximadamente 154 pb. Por isso, pode-se afirmar que as amostras eram negativas para neosporose, não sendo necessário sequenciá-las.

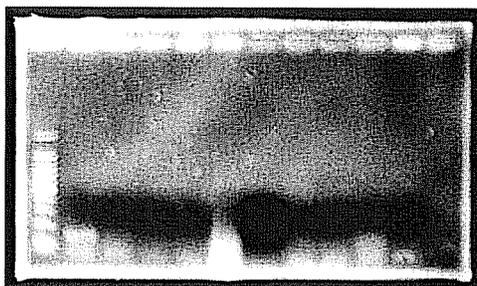


Figura 1 – Resultados de PCR das amostras estudadas (canaleta 1 = marcador de 100pb; canaleta 2 = controle positivo; canaletas 3 a 11 = amostras; e canaleta 12 = controle negativo).

## Conclusão

Pode-se concluir que este trabalho possibilitou o estabelecimento de uma metodologia eficiente de extração de DNA, de amostras de tecidos conservadas por longo período, e o diagnóstico de *N.caninum* por técnica molecular. Contudo, não foi possível estabelecer nova data para o relato do primeiro caso de neosporose com as amostras analisadas.

## Referências Bibliográficas

- BJERKAS, I.; MOHN, S.F. ; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd**, v. 70, p. 271-274, 1984.
- DUBEY, J. P. *et al.* New recognized fatal protozoan disease of dogs. **J. Am. Vet. Med. Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**, v. 41, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microb. Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- GONDIM, L. F. *et al.* Coyotes (*Canis tatrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p.159-161, 2004.
- HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 5, p. 632-635, 2001.
- LINDSAY, D. S. *et al.* Central nervous system neosporosis in a foal. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 507-510, 1996.
- McALLISTER, M. M. *et al.* Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1473-1478, 1998.
- TREES, A. J. *et al.* Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **Intern. J. for Parasitology**, v. 29, p. 1195-1200, 1999.

