

IDENTIFICAÇÃO DE DNA DO PROTOZOÁRIO *NEOSPORA CANINUM* NO FLUÍDO FOLICULAR BOVINO

FABIANE PEREIRA DE MORAES¹; SERGIO FARIAS VARGAS JÚNIOR²;
FABRÍCIO DIAS TORRES³; CAROLINE PINTO DE ANDRADE⁴; BERNARDO
GARZIERA GASPERIN⁵; LÍGIA MARGARETH CANTARELLI PEGORARO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – fabypmoraes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – juniorfvargas@hotmail.com

³Axys Análises – torres@axysanalises.com.br

⁴Axys Análises – cacauandrade@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

⁶Embrapa Clima Temperado – ligia.pegoraro@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

As desordens reprodutivas em bovinos são responsáveis por grandes prejuízos econômicos acarretando aumento do número de descartes, despesas com tratamentos veterinários, queda na produção e diminuição da rentabilidade dos diferentes sistemas de produção. A neosporose tem sido apontada como a maior causa da ocorrência de falhas reprodutivas em diferentes rebanhos bovinos em todo mundo. Essa doença possui como agente etiológico o protozoário intracelular obrigatório, *Neospora caninum*, sendo os canídeos os hospedeiros definitivos, e os bovinos, equinos e caprinos os hospedeiros intermediários. Nos rebanhos atingidos pela neosporose são observados abortos, repetição de cio, e por consequência diminuição na produção de leite e aumento de despesas veterinárias. Estudos anteriores relataram que no Brasil são atribuídas perdas econômicas anuais nos rebanhos leiteiros de U\$ 50 milhões devido a falhas reprodutivas causadas pela neosporose (REICHEL et al. 2013). Nos estudos conduzidos por GINDRI et al. (2018) e SOUZA et al. (2017), foram analisados os fatores de risco e prevalência da neosporose em rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul, onde foi evidenciado uma elevada prevalência de rebanho (89%) e cerca de 32% de prevalência individual, demonstrando assim a circulação do agente nos rebanhos, sendo a aquisição de animais sem controle sanitário um fator de risco.

A principal forma de transmissão da enfermidade é pela via vertical (via transplacentária). Uma possível transmissão via venérea tem sido investigada e sua implicação no uso das tecnologias de reprodução assistida tem sido avaliada em alguns estudos. A inseminação artificial com sêmen contaminado foi capaz de promover a infecção em novilhas (SERRANO et al., 2006), a identificação do DNA do *N. caninum* no fluido folicular indicou um tropismo do protozoário pelo ovário bovino (SILVA et. 2012) e a eliminação via sêmen de touros e carneiros infectados naturalmente tem sido demonstrada (CAETANO DA SILVA et al., 2004; FERRE et al., 2005, 2008; KOCH et al., 2019). Estes dados indicam a necessidade da realização de estudos complementares para elucidar a possível transmissão do agente via gametas e sua implicação no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. Considerando que o animal portador do *N. caninum* pode eliminar o agente de forma intermitente nas células germinativas, se submetido a processos estressantes e imunossupressores, formulou-se a hipótese que o tempo decorrido entre o parto ou aborto e a coleta da amostra pode influenciar na identificação do DNA do agente. O objetivo do estudo foi avaliar se existe a presença de DNA do protozoário *Neospora caninum* no fluido folicular, tecido endometrial e na secreção da glândula mamária (leite) de fêmeas bovinas naturalmente infectadas com *N.*

caninum, em diferentes períodos (30,60 e 90 dias) após parto a termo ou perda reprodutiva (aborto).

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado no período de março a setembro de 2023, na Estação Experimental Terras Baixas (ETB) da Embrapa Clima Temperado. Foram utilizadas fêmeas bovinas da raça Jersey, com histórico de sorologia positiva ao *N. caninum* pelo teste de Elisa (kit comercial IDEXX® Neospora X2, IDEXX Laboratories, Inc., EUA).

As coletas das amostras foram realizadas em três fêmeas, sendo uma fêmea com relato de aborto ao redor do quinto mês de gestação, e as outras duas fêmeas sem a ocorrência de perdas reprodutivas e com parto a termo. O fluido folicular, amostra uterina e leite foram coletados em diferentes momentos, sendo efetuado 30, 60 e 90 dias após o parto normal ou ocorrência da falha reprodutiva (aborto).

Para a realização da coleta das amostras de fluido folicular, as fêmeas foram submetidas a anestesia epidural baixa e a aspiração folicular efetuada com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia equipado com uma sonda de 7,5 MHz e um sistema de agulha acoplada a uma seringa. As amostras de tecido endometrial foram coletadas posteriormente, por via transcervical, utilizando-se escovas citológicas (Cytobrush). Para coletas de amostras de leite, os tetos ou papilas de cada glândula mamária foram higienizados e ordenhados manualmente.

Após a coleta, as amostras foram mantidas em criotubos a -20°C até o envio ao Laboratório Axys Diagnóstico Veterinário (Porto Alegre, RS) para realização do PCR em tempo real (rtPCR). A metodologia utilizada para o rtPCR foi segundo protocolo utilizado pelo laboratório para a detecção do *N. caninum* em outros tecidos. O equipamento de PCR em tempo real utilizado foi QuantStudio da ThermoFisher Scientific. O rtPCR para DNA do *N. caninum* em Syber Green utilizando seguinte metodologia: 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60°C por 30 segundos e 73 °C por 30 segundos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises via rtPCR detectaram a presença de DNA do *N. caninum* no fluido folicular em duas fêmeas nas amostras coletadas 90 dias após o parto, e/ou aborto, conforme descrito na Tabela 1.

Esses resultados preliminares indicam uma circulação do agente de uma forma intermitente no trato reprodutivo de fêmeas bovinas com sorologia positiva ao *N. caninum*. Da mesma forma, os estudos de FERRE et al. (2008) demonstraram a presença intermitente do parasita no sêmen de touros experimentalmente reinfetados e cronicamente infectados.

Ao nosso conhecimento, há apenas um estudo demonstrando a detecção de *N. caninum* no fluido folicular de fêmeas com histórico de aborto nos últimos 90 dias antes da coleta das amostras (SILVA et. 2012). Portanto, a cinética da detecção do DNA do agente em diferentes momentos após o parto ou aborto ainda é desconhecida.

O estudo ainda está em andamento para obtenção de resultados complementares, com o acompanhamento e análise molecular em amostras de outros animais naturalmente infectados em diferentes períodos. Entretanto, esses primeiros resultados indicam a presença do DNA do protozoário no fluido folicular 90 dias após a ocorrência da falha reprodutiva e ou parto a termo, sugerindo

implicação importante no uso das tecnologias de reprodução assistida em bovinos. Nas próximas etapas será avaliado o potencial de transmissão da neosporose por meio da produção *in vitro* ou *in vivo* de embriões. Caso comprovada a possibilidade de transmissão, a identificação dos momentos em que há maior presença de DNA de *N. caninum* no trato reprodutivo após o parto ou aborto pode nortear estratégias para minimizar os riscos de transmissão da doença.

Tabela 1: Amplificação de DNA do protozoário *N. caninum* no fluido folicular (FF), tecido endometrial (Cytobrush) e leite, em diferentes períodos após o parto ou aborto, de fêmeas bovinas com sorologia positiva para *N. caninum*.

Animal e tipo de amostra	Momento da coleta das amostras (após aborto ou parto a termo)		
	30 dias	60 dias	90 dias
01 FF	-	-	-
01 Cytobrush	-	-	-
01 Leite	-	-	-
02 FF	-	-	+
02 Cytobrush	-	-	-
02 Leite	-	-	-
03 FF	-	-	+
03 Cytobrush	-	-	-
03 Leite	-	-	-

4. CONCLUSÕES

Em fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo protozoário *N. caninum* foi detectado DNA do protozoário no fluido folicular 90 dias após o parto e/ou aborto. No entanto, não foi detectada a presença do protozoário em amostras de tecido endometrial e no leite em nenhum dos períodos coletados durante o experimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAETANO DA SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329-1336, 2004.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNANDEZ, E. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.63, p.1504–18, 2005.

FERRE, I.; SERRANO-MARTINEZ, E.; MARTINEZ A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; DEL-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-

MORA, L.M. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, v. 69, p. 905–911, 2008.

GINDRI, P. C.; MION, B.; PRADIEÉ, J.; BIALVES, T.S.; SOUZA, G.N.; DELLAGOSTIN, O.A.; SCHNEIDER, A.; PEGORARO, L.M.C. Seroprevalence estimate and associated risk factors for neosporosis in dairy cattle in the northwest region of Rio Grande do Sul State. **Ciência Rural**, v. 48, n. 7, 2018.

KOCH, M.O.; DITTRICH, R.L.; WEISS, R.R.; BREGSTEIN-GALAN, T.G.; AGUIAR, D.M.; BRANDÃO, Y. de O.; CRUZ, A.A.; BUSCH, A.P.B.; MONTEIRO, A.L.G. Detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in semen of naturally infected rams. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.47, p.1656, 2019.

REICHEL, M.P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, A.M.; GONDIN, L.F.P.; ELLIS, J.T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion-dollar question. **International journal of Parasitology**, v.43, p. 133-142, 2013.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTINEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 197-203, 2006.

SILVA, A.; RANGEL, L.; ORTIZ, C.G.; MORALES, E.; ZANELLA, E.; CASTILLO-VELÁSQUEZ, U.; GUTIERRES, C.G. Increased incidence of DNA amplification in follicular than in uterine and blood samples indicates possible tropism of *Neospora caninum* to the ovarian follicle. **Veterinary Parasitology**, v.188, p. 175-178, 2012.

SOUZA, G.N. DE; PEGORARO, L.M.C.; WEISSHEIMER, C.F.; FISCHER, G. DELLAGOSTIN, O.A.; BIALVES, T.S.; GINDRI, P.; LUCAS, R.M.; MULLER, L.; CAVALCANTI, F.; WEILLER, O.H. Situação epidemiológica e fatores de risco para problemas reprodutivos em bovinos leiteiros localizados em diferentes mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul 2016/2017. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 36, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 22 p., 2017.