



Detecção do DNA do protozoário *Neospora caninum*
no líquido folicular de doadoras bovinas



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura e Pecuária**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
371**

Detecção do DNA do protozoário *Neospora caninum*
no líquido folicular de doadoras bovinas

Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro
Bernardo Garziera Gasperin
Sergio Farias Vargas Junior
Fabiane Pereira de Moraes
Fabricio Dias Torres
Caroline Pinto de Andrade

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2023

Embrapa Clima Temperado

BR-392, km 78, Caixa Postal 403
96010-971, Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8100
www.embrapa.br/clima-temperado
www.embrapa.br/fale-conosco

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Clima Temperado

Comitê Local de Publicações

Presidente

Luis Antônio Suita de Castro

Vice-presidente

Walkyria Bueno Scivittaro

Secretária-executiva

Bárbara Chevallier Cosenza

Membros

*Ana Luiza B. Viegas, Fernando Jackson,
Marilaine Schaun Pelufê, Sonia Desimon*

Revisão de texto

Bárbara Chevallier Cosenza

Normalização bibliográfica

Marilaine Schaun Pelufê

Editoração eletrônica

Nathália Santos Fick

Foto da capa

Ligia Pegoraro

1ª edição

Publicação digital (2023): PDF

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

D479 Detecção do DNA do protozoário *Neospora caninum*
no líquido folicular de doadoras bovinas /
Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro ... [et al.]. –
Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2023.
9 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /
Embrapa Clima Temperado, ISSN 1981-5980 ;371)

1. Gado. 2. Bovino. 3. Reprodução. 4. Protozoário.
5. Neosporose caninum. I. Pegoraro, Ligia Margareth
II. Gasperin, Bernardo Gaziera. III. Vargas Junior, Sergio Farias.
IV. Moraes, Fabiane Pereira de. V. Torres, Fabrício Dias.
VI. Andrade, Caroline Pinto. VII. Embrapa Clima Temperado. VIII. Série.

CDD 636

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e métodos	7
Resultados e discussão.....	8
Conclusões.....	8
Referências	9

Detecção do DNA do protozoário *Neospora caninum* no líquido folicular de doadoras bovinas

Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro¹

Bernardo Garziera Gasperin²

Sergio Farias Vargas Junior³

Fabiane Pereira de Moraes⁴

Fabricio Dias Torres⁵

Caroline Pinto de Andrade⁶

Resumo — As desordens reprodutivas causadas por agentes patogênicos promovem grandes prejuízos econômicos aos sistemas de produção animal. O estudo da transmissibilidade de agentes patogênicos, como o protozoário *Neospora caninum*, visa o controle das anormalidades, e a minimização das perdas. O objetivo do estudo foi avaliar a presença do *N. caninum* no líquido folicular e tecido endometrial em fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo agente. As análises moleculares via rtPCR demonstraram a presença do DNA do agente no líquido folicular 90 e 120 dias após o parto e/ou aborto. Esse resultado preliminar indica a necessidade de estudos complementares para elucidar uma possível transmissão via gametas e no uso das tecnologias de reprodução assistida (TRA) em doadoras com sorologia positiva ao agente.

Termos para indexação: neosporose; bovinos; falhas reprodutivas.

¹ Médica-veterinária, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

² Médico-veterinário, doutor em Medicina Veterinária, professor adjunto de Reprodução Animal, Universidade Federal de Pelotas, RS

³ Médico-veterinário, doutor em Ciências, professor substituto da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS

⁴ Médica-veterinária, doutora em Ciências, bolsista pós-doutorado Júnior do CNPq/INCT, Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia

⁵ Médico-veterinário, doutor em Biologia Molecular, empresário, Laboratório Axys Diagnóstico Veterinário, Porto Alegre, RS

⁶ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, consultora técnica do Laboratório Axys Diagnóstico Veterinário, Porto Alegre, RS

DNA detection of the protozoan *Neospora caninum* in the follicular fluid of bovine female donors

Abstract — Reproductive disorders caused by pathogenic agents cause great economic losses to animal production systems. The study of the transmissibility of pathogenic agents, such as the protozoan *Neospora caninum*, aims to control abnormalities and minimize losses. The objective of the study was to evaluate the presence of *N. caninum* in the follicular fluid and endometrial tissue in bovine females naturally infected by the agent. Molecular analyzes via rtPCR demonstrated the presence of the agent's DNA in the follicular fluid 90 and 120 days after giving birth and/or having an abortion. This preliminary result indicates the need for additional studies to elucidate a possible transmission via gametes and the use of ART in donors with positive serology to the agent.

Index terms: neosporose; bovine; reproductive failures.

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. A neosporose acarreta perdas econômicas aos sistemas de produção. Nos rebanhos bovinos atingidos, são observados abortos, repetição de cio, e, por consequência, diminuição na produção de leite e aumento de despesas veterinárias.

A principal forma de transmissão da enfermidade é pela via vertical (via transplacentária). Estudos anteriores relataram que no Brasil são atribuídas perdas econômicas anuais nos rebanhos leiteiros de US\$ 50 milhões, devido a falhas reprodutivas causadas pela neosporose (Reichel et al., 2013). Em um estudo efetuado por Souza et al. (2017) e Gindri et al. (2018), foram analisados os fatores de risco e prevalência da neosporose em rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul. Nesses estudos foi evidenciada 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.

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 al., 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). Esses 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. Isso porque o animal portador do *N. caninum* pode eliminar o agente de forma intermitente nas células germinativas, se submetido a processos estressantes e imunossupressores.

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de DNA do protozoário *Neospora caninum* no líquido folicular e tecido endometrial de doadoras bovinas naturalmente infectadas com *N. caninum*, em diferentes períodos de tempo (30, 60, 90 e 120 dias), após parto a termo ou perda reprodutiva (aborto). O conteúdo desta publicação está relacionado aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), instituídos pela Organização das Nações Unidas (ONU), que visa superar desafios da população mundial, estando de acordo com o ODS 2, referente a “Fome zero e agricultura sustentável”.

Material e métodos

O estudo foi realizado no período de março a setembro de 2023 na Estação Experimental Terras Baixas (ETB) da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. As análises moleculares via reação em cadeia da polimerase em tempo real (rtPCR) foram efetuadas no Laboratório Axys Diagnóstico Veterinário, Porto Alegre, RS. Os animais utilizados foram 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 sem a ocorrência de perdas reprodutivas e com a gestação a termo. O líquido folicular (LF) e raspado do tecido endometrial (TEN) foram coletados em diferentes momentos, 30, 60 e 90 dias após o parto normal ou ocorrência da falha reprodutiva (aborto).

Para a realização da coleta das amostras, as fêmeas foram submetidas a anestesia epidural baixa, e a aspiração folicular foi efetuada com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia equipado com sonda de 7,5 MHz e sistema de agulha acoplada a uma seringa. As amostras de tecido endometrial foram coletadas

transcervicalmente utilizando-se escovas citológicas (*cytobrush*). Após a coleta, as amostras (LF e TEN) foram mantidas em criotubos a -20 °C até o envio ao laboratório Axys para realização do PCR em tempo real (rtPCR). A metodologia utilizada para o rtPCR seguiu protocolo utilizado pelo referido laboratório para a detecção do *N. caninum* em outros tecidos. O equipamento de PCR em tempo real utilizado foi o quantStudio da ThermoFisher Scientific. O rtPCR para DNA do *N. caninum* em Sybr Green utilizou a 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.

Resultados e discussão

As análises via rtPCR detectaram a presença do DNA do *N. caninum* no LF em duas fêmeas nas amostras coletadas 90 e 120 dias após o parto ou aborto, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Amplificação do DNA do protozoário *N. caninum* no líquido folicular (LF) e tecido endometrial (TEN) em diferentes períodos de tempo após parto ou aborto em vacas Jersey com histórico de sorologia positiva.

Identificação do animal	Tipo de amostra	Período de coleta das amostras (dias após aborto ou parto a termo)			
		30	60	90	120
1	LF ⁽¹⁾	-	-	-	-
	TEN ⁽²⁾	-	-	-	-
2	LF	-	-	+	+
	TEN	-	-	-	-
3	LF	-	-	+	-
	TEN	-	-	-	-

⁽¹⁾ Líquido folicular

⁽²⁾ Tecido endometrial

Esses resultados preliminares indicam uma circulação do agente de forma intermitente no trato reprodutivo de fêmeas bovinas com sorologia positiva ao *N. caninum*. O DNA foi detectado em diferentes períodos em uma das fêmeas (90 e 120 dias). Por outro lado, em outra fêmea somente foi detectado em um único período (90 dias). Da mesma forma, os resultados obtidos por Silva et al. (2012) mostraram a detecção do DNA do parasita em fêmeas bovinas com perdas gestacionais aos 90 dias. Os estudos de Ferre et al. (2008) demonstraram a presença intermitente do parasita no sêmen de touros experimentalmente reinfetados e cronicamente infectados.

Esses primeiros resultados indicam a presença do DNA do protozoário no LF 90 e 120 dias após a ocorrência da falha reprodutiva ou parto a termo.

Este 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 de tempo.

Conclusões

Em doadoras bovinas naturalmente infectadas pelo protozoário *N. caninum* detecta-se DNA do protozoário no líquido folicular 90 e 120 dias após o parto ou aborto. No entanto, não foi detectada a presença do protozoário em amostras de tecido endometrial em nenhum dos períodos coletados durante o experimento.

Os resultados indicam a necessidade da revisão dos padrões sanitários atuais quanto ao controle do patógeno *N. caninum* no uso das tecnologias de reprodução assistida (TRA) em bovinos.

Referências

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.1504-1518, 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. de, 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, 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**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2017. 22 p. (Embrapa Gado de Leite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 36).

Embrapa

Clima Temperado