

CARLOS CZPAK KROETZ

**HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA E METABOLISMO OXIDATIVO EM  
PORCAS GESTANTES INOCULADAS COM *Neospora caninum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agroveterinárias, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mere Erika Saito

**LAGES/SC  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Kroetz, Carlos Czapak  
Hematologia, bioquímica e metabolismo oxidativo em  
porcas gestantes inoculadas com Neospora caninum / Carlos  
Czapak Kroetz. -- 2019.  
72 p.

Orientador: Mere Erika Saito  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,  
2019.

1. Hematologia . 2. Metabolismo oxidativo. 3. Gestação. 4.  
Suíno. 5. Neospora. I. Saito, Mere Erika. II. Universidade do  
Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal. III. Título.

CARLOS CZPAK KROETZ

HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA E METABOLISMO OXIDATIVO EM  
PORCAS GESTANTES INOCULADAS COM *Neospora caninum*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal,  
como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientadora: Mere Erika Saito

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mere Erika Saito

Universidade do Estado de Santa Catarina – Lages, SC

Membro

Rosângela Locatelli Dittrich

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosângela Locatelli Dittrich.

Universidade Federal do Paraná – Curitiba – PR

Membro

Anderson Barbosa de Moura

Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

Universidade do Estado de Santa Catarina – Lages, SC.



## **AGRADECIMENTOS**

Início dedicando essas palavras aos meus avós maternos, Catarina e Marquiano integrantes de uma geração de imigrantes que prioriza e valoriza o trabalho duro o respeito e a dignidade, de forma simples demonstram o exemplo que vem sendo passado para as gerações da nossa família, me faz muito feliz e me impulsiona cada vez mais saber que os senhores tem orgulho de mim, muito obrigado.

Ao meu Pai, Luiz Vicente e minha mãe Eliceia, vocês são as pessoas que sempre demonstraram que todo ser humano tem o seu valor, tratar as pessoas com igualdade é um princípio básico para conseguir viver em uma sociedade complexa, mas que com atitudes simples é possível viver de forma harmônica.

Meus amigos, levo vocês como troféus pra onde vou, tenho orgulho de fazer parte da vida de vocês, a força que vocês me dão não é possível de ser descrita aqui, mas eu sei que deixando registrado, demonstra a importância e a relevância que vocês tem na minha vida.

Querida professora Dr<sup>a</sup> Mere Erika Saito, obrigado pela oportunidade, e muito obrigado por me fazer enxergar a vida por uma ótica diferente, sem dúvida vai ser meu maior aprendizado durante todo esse processo.

As residentes, Mariangela e Ana Cristina, a ajuda de vocês foi essencial para o resultado final desse projeto, a maneira responsável que vocês conduziam as análises é admirável, obrigado.

Aos integrantes do laboratório de parasitologia, Professor Anderson, Alessandra, Gilberto e Gilmar, o apoio mutuo e a parceria foi o que fez todo esse trabalho de meses chegar ao fim de forma honrosa.

Eu agradeço aos animais que de forma não opcional participaram desse projeto, eu acredito que um dia as pessoas terão noção da pureza que vocês carregam e assim os respeitando.

Ao Professor Luiz Claudio Miletti por conceder o laboratório de bioquímica e biologia molecular, graças a disponibilidade dos equipamentos as análises puderem ser concluídas, muito obrigado.

Ao professor José Cristani, por todo o investimento, ao tempo, conhecimento e disposição em ajudar independente do dia e hora, sempre disposto em ajudar.

## RESUMO

KROETZ, C. C. **Hematologia, bioquímica, e metabolismo oxidativo em porcas gestantes inoculadas com *Neospora caninum***. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de concentração: Sanidade e Patologia Animal) - Universidade do estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2018.

O investimento na suinocultura brasileira a cada ano que passa aumenta significativamente, e com isso o interesse em estudar esta espécie. Os estudos dos parâmetros hematológicos e de metabolismo oxidativo nesta espécie ainda são escassos. Durante a gestação o estresse oxidativo ocorre com maior intensidade devido ao aumento do aporte de oxigênio, utilização de energia e devido a sua extensa divisão celular e alta atividade metabólica. São raros os trabalhos de *N. caninum* em suínos, porém sabe-se que esse protozoário infecta essa espécie animal, pois estudos de prevalência foram desenvolvidos em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar marcadores de estresse oxidativo, fragilidade osmótica eritrocitária e parâmetros hematológicos e de bioquímica sérica em porcas gestantes inoculadas com taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*. Foram utilizadas nove porcas divididas em dois grupos, seis inoculadas com neospora e três não inoculadas, sendo avaliados períodos alternados de gestação (0 sendo as porcas vazias, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação). Foram avaliados o hemograma, a bioquímica clínica, no qual foram dosadas ureia, creatinina, proteína sérica total (PST), albumina, globulinas, gama glutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e glicose. Para avaliação do metabolismo oxidativo foram utilizados, as concentrações de malondialdeído eritrocitário (MDA) e glutathione reduzida eritrocitária (GSH). Para avaliação da fragilidade osmótica eritrocitária foram utilizadas concentrações de 0,85% a 0,00% de cloreto de sódio (NaCl) e foi calculada a hemólise em 50%, das amostras, onde não foi observado diferença estatística. No hemograma foi observada diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em volume globular, do momento basal para todos os outros momentos sem diferenças entre grupos. As diferenças em bioquímica clínica foram em creatinina e AST ( $P < 0,05$ ). Nas concentrações dos marcadores de estresse oxidativo foi observada diferença estatística ( $P < 0,05$ ), na dosagem de MDA do dia 60 sem *N. caninum* para todos os outros momentos, e com neospora, entre o dia 60 e 100, entre os grupos se observou diferença em 60 e 100 dias. Os valores de GSH para o grupo sem neospora o dia 100 foi diferente de todos os outros momentos. Entre os grupos houve diferença entre o momento 0, 45, 80 e 100 dias de gestação. Concluímos que os achados nas alterações laboratoriais de rotina na gestação foram previsíveis, mas pouco perceptíveis em relação ao inóculo, sendo o metabolismo oxidativo mais sensível.

**Palavras chave:** Hematologia. Metabolismo Oxidativo. Gestação. Suíno. Neospora.





## ABSTRACT

KROETZ, C. C. **Hematology, biochemistry, and oxidative metabolism in pregnant sows inoculated with *Neospora caninum***. 2019. Dissertation (Master in Animal Science - Area of concentration: Animal Health and Pathology) - State University of Santa Catarina. Graduate Program in Animal Science, Lages, 2018.

The investment in Brazilian pig farms each year increases significantly, and with that the interest in studying this species. Studies of hematological and oxidative metabolism parameters in this species are still scarce. During gestation oxidative stress occurs with greater intensity due to increased oxygen supply, energy utilization and due to its extensive cell division and high metabolic activity. However, it is known that this protozoan infects this animal species, since prevalence studies have been carried out in several regions of the world, including Brazil. The objective of this study was to evaluate markers of oxidative stress, erythrocyte osmotic fragility and hematological parameters and serum biochemistry in pregnant sows inoculated with tachyzoites of *N. caninum* strain Nc1. Nine sows were divided into two groups, six inoculated with neospora and three non-inoculated, and alternating periods of gestation were evaluated (0 being the empty sows, 45, 60, 80 and 100 days of gestation). The hemogram, clinical biochemistry, in which urea, creatinine, total serum protein (PST), albumin, globulins, gamma glutamyltransferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST) and glucose were measured. Erythrocyte malondialdehyde (MDA) and erythrocyte reduced glutathione (GSH) were used to evaluate oxidative metabolism. For the evaluation of erythrocyte osmotic fragility concentrations of 0.85% to 0.00% sodium chloride (NaCl) were used and 50% hemolysis of the samples was calculated, where no statistical difference was observed. The hemogram showed a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) in the globular volume, from baseline to all other moments without differences between groups. Differences in clinical biochemistry were in creatinine and AST ( $P < 0.05$ ). In the concentrations of the oxidative stress markers, a statistical difference ( $P < 0.05$ ) was observed in the MDA dosage of day 60 without *N. caninum* for all other moments, and with neospora, between day 60 and 100, between groups difference was observed in 60 and 100 days. The GSH values for the group without neospora at day 100 were different from all other moments. Among the groups there was a difference between the 0, 45, 80 and 100 days of gestation. We concluded that the findings in routine laboratory abnormalities in pregnancy were predictable, but not very noticeable in relation to the inoculum, with oxidative metabolism being more sensitive.

**Keywords:** Hematology. Oxidative Metabolism. Gestation. Swine. Neospora.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo biológico de <i>N. Caninum</i> .....	26
---	----



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores médios $\pm$ desvio padrão do eritrograma de matrizes suínas inoculadas com <i>N. caninum</i> (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação. $P < 0,05$ . ....	47
Tabela 2 Valores médios $\pm$ desvio padrão do leucograma de matrizes suínas inoculadas com <i>N. caninum</i> (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação. ....	49
Tabela 3 Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem de plaquetas e mensuração de PPT de matrizes suínas inoculadas com <i>N. caninum</i> (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação. ....	50
Tabela 4- Valores médios $\pm$ desvio padrão de bioquímica clínica sanguínea de matrizes suínas inoculadas com <i>N. caninum</i> (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação $P < 0,05$ . ....	52
Tabela 5 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de Malondialdeído (MDA) e Glutathione Reduzida (GSH) de matrizes suínas inoculadas com <i>N. caninum</i> (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação. $P < 0,05$ . ....	54
Tabela 6 Valores médios $\pm$ desvio padrão da fragilidade osmótica eritrocitária de matrizes suínas inoculadas com <i>N. caninum</i> (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação. ....	56



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Fragilidade osmótica eritrocitária, de matrizes suínas com neospora, aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.....	56
Gráfico 2 Fragilidade osmótica eritrocitária, de matrizes suínas sem neospora, aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.....	57





## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AST	Aspartato aminotransferase
BHT	hidroxitolueno butilado
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animal
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
DPI	Dias pós iniculação
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPO	Eritropoietina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FOE	Fragilidade Osmótica Eritrocitária
FSH	Hormônio folículo estimulante
GGT	Gama glutamiltransferase
GSHPx	Glutathione Peroxidase
GSH-Red	glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
H	Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LH	Hormônio luteinizante
MDA	Malondialdeído
NaCL	Cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
OH	Hidroxila
O2	Oxigênio
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPT	Proteína Plasmática Total
PST	Proteína sérica total
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

VG Volume Globular

VGM Volume Globular Médio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1 SUÍNOS E GESTAÇÃO .....	23
2.2 NEOSPOROSE.....	24
2.2.1 <i>Neospora caninum</i> em suínos .....	28
2.3 HEMATOLOGIA .....	29
2.4 BIOQUÍMICA CLÍNICA.....	30
2.4.1 Ureia e Creatinina.....	30
2.4.2 Proteínas Plasmáticas .....	31
2.4.3 Aspartato aminotransferase (AST) e Gamaglutamiltransferase (GGT).....	32
2.4.4 Glicose.....	33
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO .....	34
2.6 FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA (FOE).....	36
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>39</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	39
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 LOCAL .....	41
4.2 ANIMAIS .....	41
4.3 AMOSTRAS.....	42
4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	42
4.4.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) .....	42
4.4.2 Hemograma .....	42
4.4.3 Análise bioquímica.....	43
4.4.4 Metabolismo oxidativo.....	43
4.4.4.1 Malondialdeído eritrocitário (MDA) .....	43
4.4.4.2 <i>Glutathione reduzida eritrocitária (GSH)</i> .....	44
4.4.5 Fragilidade osmótica eritrocitária.....	44
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI). ....	47
5.2 HEMOGRAMA.....	47
5.3 LEUCOGRAMA .....	49

5.4 PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL E PLAQUETAS .....	50
5.5 BIOQUÍMICA CLÍNICA.....	51
5.6 METABOLISMO OXIDATIVO ERITROCITÁRIO .....	54
5.6 FRAGILIDADE OSMÓTICO ERITROCITÁRIA (FOE).....	56
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A criação de porcos do passado evoluiu também na técnica e no modelo de coordenação das atividades entre fornecedores de insumos, produtores rurais, agroindústrias, atacado, varejo e consumidores. Passou a ser uma cadeia de produção de suínos, explorando a atividade de forma econômica e competitiva (GOLÇALVES, 2006).

A China é o maior produtor mundial, respondendo por quase a metade da produção e consumo do mundo. O Brasil produziu 3,725 milhões de toneladas de carne suína e exportou 786 mil toneladas ocupando o 4º lugar no ranking mundial nas categorias produção e exportação. O estado de Santa Catarina ocupa o primeiro lugar no ranking nacional de produção e exportação (EMBRAPA, 2018).

Ainda são escassos os estudos relacionados a marcadores de estresse oxidativo e à fragilidade osmótica eritrocitária no período de gestação de matrizes suínas em conjunto com agentes infecciosos. Entre esses agentes infecciosos temos o *Neospora caninum*, um protozoário pertencente ao phylum Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (ANDREOTTI et al., 2003). *N. caninum* é um parasita intracelular obrigatório que despontou como a principal causa de abortos em bovinos leiteiros, em vários países (DUBEY., et al 2011). A infecção provoca perdas econômicas importantes em bovinos devido à falha reprodutiva associadas com o aborto e mortalidade em bezerros congenitamente infectados (DUBEY., et al 2007). Além de infectar bovinos, outras espécies podem ser acometidas como: os ovinos, caprinos, bubalinos, canídeos, cervídeos e camelos. Já foram encontradas também, infecções experimentais em leporinos felinos, canídeos, roedores, primatas e suínos (JUNIOR & ROMANELLI, 2006).

No Brasil, Soares et al. (2016) analisaram amostras de 83 porcos-monteiro da região do Pantanal, MS, e encontraram 10,8% das amostras positivas. No Estado de Santa Catarina, foi verificada ocorrência de 18,9% (94/498) em matrizes de rebanhos comerciais (SILVA, 2017). Essas infecções podem aumentar o metabolismo oxidativo dos animais, causando danos irreparáveis para a saúde animal (LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007).

MARIELLA et al. (2014) constataram que estresse oxidativo pode ocasionar problemas durante a gestação. Período em que ocorrem alterações fisiológicas e metabólicas, resultando em maior consumo de oxigênio, consequentemente com alterações no consumo de energia e maior exposição ao estresse oxidativo, podendo

causar reabsorção e abortamentos. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio é denominado espécies reativas de oxigênio (ERO) (BARREIROS e DAVID, 2006). Sabe-se que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, assim como a remoção insuficiente leva ao chamado estresse oxidativo (ZHOU et al., 2009).

Em condições normais, os organismos vivos dispõem de sistemas antioxidantes de defesa, constituídos por antioxidantes não enzimáticos, (vitaminas A e E, pró-βcarotenos, ácido úrico, entre outros), e por um sistema enzimático, composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione peroxidase (GSHPx) e a glutathione redutase (GSH-Red), capazes de metabolizar os radicais livres de oxigênio (RAMOS et al, 2000). A produção de ERO está elevada nas lesões teciduais causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, devido a um conjunto de processos como o aumento de enzimas envolvidas na formação de radicais e a ativação da fagocitose (ROCK et al., 1996).

Não há dados na literatura avaliando o perfil hematológico, bioquímico e o metabolismo oxidativo de suínos inoculados com *Neospora caninum* durante períodos variados de gestação, dificultando a compreensão das mais variadas alterações.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SUÍNOS E GESTAÇÃO

Há uma grande discussão sobre a origem dos suínos e como ocorreu sua domesticação. Os fósseis encontrados dos possíveis ancestrais dos suínos confundem os zoólogos, que não chegam a um consenso em relação a uma teoria que explique o surgimento dos porcos como são hoje. Atualmente, os estudos aceitam que os suínos apareceram na Terra há mais de 40 milhões de anos. No Brasil os primeiros animais chegaram em 1534 em São Vicente com Martim Afonso de Souza (1500-1571). Os rebanhos por aqui evoluíram bastante e já em 1580, viajantes e cronistas descreviam a quantidade de porcos que viam nas diversas regiões. No final do século XVII e durante o século XVIII, Minas Gerais se destacava como o maior produtor de suínos da colônia (COSTA, 2018).

Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2016), no ano de 2015 foram abatidos 39.263.964 suínos no Brasil, sendo o Estado de Santa Catarina, líder com mais de 10 milhões de cabeças abatidas (aproximadamente 27% do valor total). A suinocultura é considerada atividade de grande importância por gerar empregos, volume em exportações e por produzir proteína de alta qualidade em área reduzida e em curto espaço de tempo (FÁVERO e BELLAVER 2002).

À medida que os sistemas de produção de suínos se tornaram maiores e cada vez mais padronizados, o fluxo de animais pelas instalações aumentou consideravelmente de importância, tanto para recria como reprodução (SILVEIRA, 2007).

As gestações de suínos duram entre 114 a 116 dias, com uma amplitude de 110 a 119 dias. Entretanto, deve-se considerar que o período gestacional pode ser influenciado por alguns fatores como genética, o tamanho da leitegada e a estação do ano, além do ambiente (MELLAGI, 2006). Para que a gestação transcorra normalmente, é necessário que ocorram adaptações que possam tolerar a presença do feto, o qual seria considerado estranho ao organismo materno por possuir metade de seu material genético proveniente do pai (FELICIANO et al. 2012). O aumento da eficiência reprodutiva das matrizes pode ser obtido por meio de leitegadas maiores ou pela redução do intervalo entre partos. A redução do período entre partos é limitada pelo anestro lactacional pois a hipófise diminui a sua capacidade de síntese e liberação de LH e de liberação de FSH, em função do estímulo negativo causado pela amamentação (KUNERT, 1981).

O diagnóstico precoce e preciso de fêmeas vazias possibilita aumentar a eficiência reprodutiva de um rebanho. O manejo mais difundido para a identificação de fêmeas vazias é o de detecção diária do retorno ao estro por meio da estimulação pela presença do macho (KNOX & FLOWERS, 2001). Não realizar uma boa técnica de inseminação artificial e um protocolo de inseminação que considere o uso de duas ou três inseminações artificiais durante o estro, devidamente espaçadas e de acordo com cada categoria de porca (leitoa, retorno, plurípara) e falhas no manejo da dose de sêmen com relação à sua proteção contra as variações da temperatura de armazenagem, são apontadas como potenciais causas de falhas de fertilização em matrizes (SILVEIRA, 2007). Devido ao tempo e quantidade de acúmulo de fluido, combinado com o tempo de formação do osso fetal e calcificação, o melhor momento para diagnosticar a gravidez em suínos é entre 24 e 35 dias após a reprodução (KNOX & FLOWERS, 2001).

A manutenção da gestação, em suínos, depende da secreção de progesterona pelos corpos lúteos durante todo o período gestacional. O parto tem início com a liberação de cortisol a partir dos fetos. Fêmeas com maior tamanho de leitegada apresentam menor duração da gestação (considerando como dia zero o primeiro dia de inseminação) em relação às aquelas com leitegadas pequenas (MELLAGI, 2006).

## 2.2 NEOSPOROSE

É uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum*, um parasita intracelular obrigatório pertencente ao phylum Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae. *N. caninum* tem como hospedeiro definitivo o cão, os hospedeiros intermediários são bovinos, caprinos, ovinos, equinos e cervos (Dubey & Lindsay, 1996). Foi primeiro descrito em cães em 1984, depois em bezerros com mieloencefalite, e foi posteriormente isolado em cães e nomeado em 1988 (Buxton et al., 2002). Infecções experimentais são encontradas em leporinos felinos, canídeos, roedores, primatas e suínos (JUNIOR & ROMANELLI, 2006).

Considerada uma das grandes causadoras de aborto em bovinos em todo o território nacional e internacional, sendo responsável por expressivos prejuízos econômicos a rebanhos de corte e, especialmente à pecuária leiteira (DUBEY; LINDSAY, 1996). Por sua similaridade com outro coccídio da mesma família, *Toxoplasma gondii*, *N. caninum* só teve seu ciclo de vida elucidado em 1998 (McALLISTER et al., 1998).



O ciclo do protozoário envolve três estágios infecciosos: os bradizoítos, os taquizoítos e os esporozoítos. Os taquizoítos e os bradizoítos são estágios intracelulares encontrados no hospedeiro intermediário, enquanto que os esporozoítos se desenvolvem dentro dos oocistos no processo de esporulação (DUBEY, 2003). Após a ingestão oral de cistos com bradizoítos por hospedeiros definitivos ocorre a endodiogenia, os bradizoítos infectam células epiteliais do intestino, com a formação de oocistos não esporulados que são excretados nas fezes (DUBEY et al., 2002a).

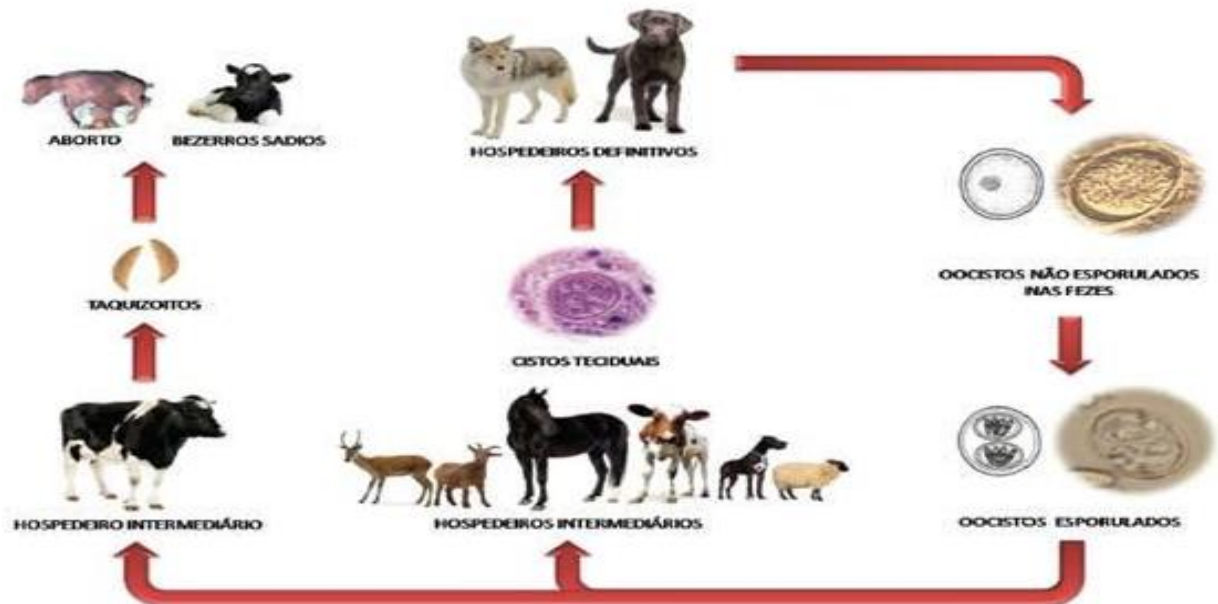
O hospedeiro intermediário se infecta ingerindo alimentos contaminados com fezes contendo oocistos esporulados. Os oocistos e esporocistos se rompem pela ação mecânica liberando os esporozoítos, que invadem os tecidos e sofrem multiplicação, penetram nas células e se transformam em taquizoítos destruindo as células e disseminando a infecção (COLLERY, 1996). Após várias multiplicações, em animais imunocompetentes, os taquizoítos se transformam em bradizoítos e encistam, permanecendo na forma crônica no hospedeiro (GOODSWEN et al., 2013).

Podem ocorrer as transmissões pelas vias horizontal e vertical. A horizontal ocorre principalmente pelo hospedeiro definitivo, o cão, que elimina oocistos do parasito através das fezes e podem contaminar materiais e alimentos utilizados durante o manejo do rebanho. (DUBEY et al. 2007). A transmissão vertical em bovinos pode ser transmitida via transplacentária, por várias gerações (ANDREOTTI, 2003). JENSEN et al. (1998), realizaram infecção experimental de porcas que levou à transmissão transplacentária de *N. caninum*. Resultados de experimentos com vacas leiteiras e de corte inoculado parenteralmente com taquizoítos *N. caninum* indicam que o feto pode ser infectado e ficar doente por quatro semanas após a inoculação do parasita. A idade gestacional pode determinar o resultado de infecção sendo que fetos infectados no início da gravidez provavelmente resultem em óbito (DUBEY, 2003).

A patogênese da neosporose depende do equilíbrio entre a capacidade do taquizoíto de penetrar e se multiplicar nas células e a capacidade do hospedeiro de inibir a proliferação do parasita. A multiplicação intracelular do parasita causa destruição tecidual e aparecimento de focos de necrose. Como consequência deste dano, ocorre uma reação inflamatória, levando à infiltração do tecido lesado com células inflamatórias, principalmente células mononucleares (FERNÁNDEZ, 2003). Após a parasitemia, o *N. caninum* estabelece-se no septo caruncular materno, antes de atravessar para as vilosidades placentárias fetais, ocorrendo o aborto quando o feto ou a placenta estão de tal forma danificados que tornam impossível a manutenção da gestação. Estes danos podem ser provocados diretamente pela multiplicação do parasita na

placenta e no feto, pela libertação de prostaglandinas maternas que podem provocar luteólise e aborto (DUBEY et al. 2011).

Figura 1 Ciclo biológico de *N. Caninum*



Fonte: CARDOSO, J. M. S. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista. **Tese de Doutorado**. USP. 2010. p. 18.

Os abortos induzidos por neosporose ocorrem normalmente em cinco e seis meses de gestação em vacas e o feto pode morrer no útero, ser reabsorvido, mumificado, autolisado, natimortos, nascidos vivos com sinais clínicos ou nascidos clinicamente normal, mas cronicamente infectado (DUBEY, 2003). Toda a infecção fetal ocorre a partir de uma parasitemia materna. Entretanto, a doença também ocorre em bovinos que já abrigaram uma infecção persistente antes do estabelecimento da gestação (BUXTON et al., 2002).

Vargas et al. (2006) concluíram que suínos que tiveram a expulsão do feto ou aborto antes dos 110 dias de gestação, podem ter como causa agentes não infecciosos em mais de 60% dos casos, e estes fatores genéricos causadores de aborto ligados ao clima são fotoperíodo decrescente, temperaturas extremas, queimaduras solares e velocidade excessiva dos ventiladores.

*Neospora caninum* em suínos selvagens (*Sus scrofa*) foi detectado na República Checa, Espanha e nos EUA (SOARES, 2016). No nordeste do Brasil porcos domésticos foram

examinados para anticorpos contra *N. caninum*, e a taxa de ocorrência de 3,1% (4/130) foi constatada (AZEVEDO, 2010).

O diagnóstico depende de uma combinação entre o histórico, sinais clínicos, dados de laboratório (ANDREOTTI, 2003) e visualização de lesões características no cérebro, coração e fígado de fetos abortados (MELO, 2006). Os principais métodos diagnósticos são parasitológicos, com os exames histopatológico e imunohistoquímica e a reação em cadeia da polimerase PCR e isolar o material que contém *N. caninum* em cultivo celular ou em animais de laboratório. E também o diagnóstico sorológico, com a pesquisa de anticorpos contra *N. caninum* (ANDREOTTI, 2003). A imunofluorescência indireta é empregada no diagnóstico sorológico da infecção e em estudos epidemiológicos, tendo sido considerada como técnica de referência. Esta técnica detecta, fundamentalmente, anticorpos que se unem a antígenos localizados na superfície celular de *N. caninum* (MELO, 2006).

O exame histopatológico do feto e da placenta nas lesões por meio da técnica de imunohistoquímica, são necessários para chegar ao diagnóstico de neosporose (ANDERSON et al, 2000). Alterações histológicas podem ocorrer em sistema nervoso central (SNC), que são caracterizadas por gliose e encefalite multifocal associada a infiltrados inflamatórios em vários outros órgãos incluindo, coração, fígado e placenta (ANDERSON et al. 1991). O método imuno histoquímico identifica cistos e taquizoítas de *N. caninum* em tecidos fetais e fetos mumificados. Os anticorpos específicos de *N. caninum* são utilizados nos cortes de cérebro, mas os parasitas também podem ser encontrados no pulmão, rins e músculos esqueléticos (ANDREOTTI, 2003).

O controle da doença depende principalmente do controle da população canina na fazenda bem como da remoção da possível fonte de infecção do alcance deles (placentas e fetos abortados). Essas medidas podem ser eficazes para impedir surtos novos, entretanto, não terão nenhum efeito no controle da recrudescência de infecções latentes (BIELSA, 2004). Não existem ainda medicamentos antineospora efetivos para o tratamento em bovinos. O tratamento por quatro semanas com trimetoprim + sulfadiazina (15 mg/kg 2 x dia) e pirimetamina (1 mg/kg 1 x dia) tem sido utilizado em cães com sintomatologia nervosa, porém os resultados são inconsistentes (ANDREOTTI, 2003).

### 2.2.1 *Neospora caninum* em suínos

A neosporose é uma doença cuja importância na espécie suína ainda não está claramente estabelecida. Sua ocorrência pode estar relacionada a casos de aborto, natimortos, retorno ao cio e outras desordens reprodutivas, reduzindo a produção comercial, gerando a necessidade de substituição de matrizes, mesmo que clinicamente sadias (WALADJO et al. 2009).

A primeira infecção experimental em suínos prenhes foi inoculada  $2,5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum*, da cepa Nc – SweB e observaram, através da reação de imunofluorescência indireta, a soroconversão em todas as fêmeas. Os autores demonstraram a possibilidade da ocorrência da transmissão transplacentária de *N. caninum* em suínos e sua relação com a dose do inóculo e o estágio da gestação em que ocorre a infecção (Jensen et al. 1998). A primeira descrição de infecção natural por *N. caninum* em suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) foi na Alemanha, ao analisar amostras de soro de 2041 suínos de 94 propriedades diferentes 3,3% dos animais foram positivos e 27,7% das propriedades possuíam pelo menos um animal positivo (DAMRIYASA et al. 2004). No Brasil, há relato da infecção por *N. caninum* em suínos domésticos no Estado da Paraíba, provenientes de abatedouros, onde se obteve resultado positivo.

Quando analisadas amostras de suínos selvagens, a ocorrência do *N. caninum* é maior se comparada com os suínos domésticos. Nos Estados Unidos, foram analisadas amostras de 1059 suínos selvagens provenientes de 29 Estados, 15% das amostras foram positivas para o protozoário e 72,4% dos Estados possuíam pelo menos um animal positivo (CEZAR et al. 2016).

São raros os trabalhos de *N. caninum* em suínos, porém sabe-se que esse protozoário infecta essa espécie animal, pois estudos de prevalência foram desenvolvidos em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil (HELMICK et al., 2002). Estudos de soroprevalência em suínos domésticos e selvagens infectados com *N. caninum* têm sido realizados nos EUA, Europa, África e Brasil a fim de verificar a presença de anticorpos contra *N. caninum* nos rebanhos comerciais e em animais de vida selvagem para avaliar a extensão de seus danos na suinocultura e a importância do ciclo selvagem nesta espécie (DA SILVA, 2017).

## 2.3 HEMATOLOGIA

A produção de eritrócitos é regulada pelo hormônio eritropoietina (EPO). Quando sensores de oxigênio localizados no córtex renal se torna hipóxico, fatores induzidos por hipóxia são gerados e incitam a transcrição do gene da eritropoietina. A EPO resultante estimula, então, os precursores eritróides na medula óssea para aumentar o número de eritrócitos, aumentando, assim, a capacidade de transporte de oxigênio da medula óssea (RANDOLPH, 2010). Eritrócitos fornecem funções do transporte de oxigênio, dióxido de carbono, transporte e tamponamento de íons de hidrogênio. Estas funções não requerem energia por si só, mas a energia na forma de ATP, NADH e NADPH é necessária para manter as células circulando por meses em um estado funcional apesar das repetidas exposições a insultos mecânicos e metabólicos (KANEKO, 2010).

A membrana permeável e deformável que envolve os componentes dos eritrócitos é composta de lipídios, proteínas e carboidratos. Alterações na composição lipídica (principalmente fosfolipídios e colesterol) da membrana podem resultar em formas anormais dos eritrócitos (TRHALL, 2012). O eritrócito dispõe de aparelhagens metabólicas e estruturais especializadas para manter a hemoglobina no seu estado funcional. Desta forma, transporta grande quantidade de oxigênio de forma relativamente segura para a sua integridade, graças a um complexo sistema de detoxificação sendo o principal tampão redox do eritrócito a glutathione (GSH), que previne o acúmulo de radicais livres e de outras espécies altamente reativas (MAY, 1998).

Os leucócitos incluem os granulócitos, monócitos e linfócitos. Todos estes têm funções de defesa imunológica. Eles podem ingerir e degradar patógenos invasores. Os linfócitos são divididos em dois grupos, linfócitos B e linfócitos T. Linfócitos B produzem anticorpos, enquanto os linfócitos T regulam a resposta imune e destroem células infectadas por vírus e células tumorais (KOOLMAN, 2005).

Como a maioria dos membros do subfilo Apicomplexa, o *N. caninum* é um parasita intracelular, sugere-se que uma resposta mediada por células seja essencial na imunidade do hospedeiro. Esta resposta é predominantemente mediada por células Th1, envolvendo principalmente linfócitos T CD4+, há também ativação de outros componentes do sistema imune como, macrófagos, células dendríticas e células natural killer (NK) (TANAKA et al, 2000). Alguns estudos, no entanto, sugerem que uma resposta balanceada Th1 e Th2 é importante para evitar que resposta imunitária seja prejudicial para o hospedeiro e feto (PIRES, 2012). Os linfócitos T do útero têm pelo menos, duas funções conhecidas. Em primeiro lugar,

estas células têm atividades efetoras/citotóxicas, eliminando antígenos nocivos de bactérias e vírus. Em segundo lugar, a regulação das células T define as propriedades fundamentais da tolerância imunológica. Assim, no interior do útero, as células T podem contribuir para o ambiente imunossupressivo local, que permite a sobrevivência do feto (SARAFANA, 2007).

A gestação está associada a uma reorientação das prioridades fisiológicas e anatômicas da gestante, que acarretam alterações nos elementos figurados e humorais sanguíneos (LOTE, 2012). Entre elas separação anatômica entre feto e mãe, imaturidade antigênica do feto e inexistência de resposta imunológica materna (SARAFANA, 2007). Este estado provoca tensões extremas no sistema hematológico, e a compreensão das alterações fisiológicas resultantes é obrigatória para a interpretação da necessidade de qualquer intervenção terapêutica (LOTE, 2012).

## 2.4 BIOQUÍMICA CLÍNICA

Análises bioquímicas podem ser utilizadas em veterinária não somente para avaliação clínica individual, mas também para avaliar e monitorar a condição nutricional e metabólica em grupos de animais. Alguns metabólitos podem funcionar como indicadores do potencial produtivo e reprodutivo dos animais, sendo que alguns desses indicadores podem ser geneticamente controlados (GONZÁLES, 2008).

Tradicionalmente, indicadores como desempenho reprodutivo, ganho de peso diário, taxa de conversão alimentar e mortalidade têm sido usados para avaliar a produtividade de rebanhos suínos. Para avaliar a saúde e o metabolismo de grupos de suínos e avaliar a influência de diferentes condições de manejo e alojamento, a medição dos níveis de metabólitos no soro fornece informações adicionais (VERHEYEN et al., 2007). Parâmetros bioquímicos de suínos são influenciados por uma ampla gama de ações ambientais e fatores fisiológicos, incluindo dieta, idade, sexo e moradia (FRIENDSHIP et al., 1984).

### 2.4.1 Ureia e Creatinina

Entre os metabólitos temos os marcadores de função renal. Os mais utilizados em medicina veterinária são, ureia e creatinina. Isso se deve à acessibilidade ao método e pela facilidade da execução da análise laboratorial de uma substância endógena em conjunto ao seu baixo custo.

A creatinina é um produto da degradação nitrogenada, e da quebra de creatina, substância presente no músculo e que está envolvida no metabolismo energético, sendo um produto endógeno do catabolismo muscular cuja concentração plasmática não se altera com a dieta, enquanto a ureia constitui um metabólito resultante final do catabolismo proteico hepático, cuja concentração pode ser alterada pela quantidade de proteína em alimentos e pela hipovolemia (GANONG, 1998). Após a formação da ureia pelo fígado, ela é transportada pelo plasma até os rins onde é excretada na urina (KERR, 2003).

Na mensuração da função renal durante a gestação, o marcador ideal para medir a taxa de filtração glomerular (TFG), que pode ser definida como o volume de plasma que é filtrado nos rins, por minuto, sendo frequentemente expressa em função do peso corporal (RENNO et al., 2000), deve ser um filtrado livre nos capilares glomerulares, ligar-se de maneira insignificativa às proteínas séricas, não ser secretado ou reabsorvido pelos túbulos renais, nem metabolizado nos rins e não expor o feto a efeitos deletérios ao seu desenvolvimento (MARQUES, 2010).

Quando se analisa o mecanismo fisiopatológico dos transtornos renais, observa-se que fatores, predisõem ao desequilíbrio oxidativo. Na maioria das vezes, o paciente renal apresenta-se malnutrido, com carência em reservas de vitaminas e minerais, o que diminui os mecanismos de defesa antioxidantes e favorece a instalação do estresse oxidativo renal, com a formação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERO), substâncias estas potencialmente lesivas ao organismo (GALVÃO, 2009).

#### 2.4.2 Proteínas Plasmáticas

O plasma contém uma mistura de proteínas – albumina, “globulinas” (imunoglobulinas, alfa, beta e gama.), enzimas, proteínas específicas de transporte (por exemplo, transferrina), hormônios proteicos e fatores de coagulação (KERR, 2003). São ainda imprescindíveis na retenção de água na corrente sanguínea, mantendo a pressão coloidosmótica para um perfeito intercâmbio de líquidos entre o sangue e os tecidos, exercendo um controle na passagem de água para o espaço extravascular, impedindo o edema (CUNNINGHAM 2002) .

O aumento da proteína plasmática ocorre na desidratação, devido à perda de líquido, parasitas e na estimulação da resposta imune (vacinação, doenças auto-imunes e inflamação crônica). A hipoproteïnemia ocorre, quase sempre, devido à diminuição da albumina, nos casos de hepatopatias e nefropatias avançadas e enterites crônicas (CAMPELO, 2018). Diferentes

situações podem determinar que a concentração das proteínas sanguíneas sofra alterações como no final da gestação e puerpério, ou mesmo durante processos infecciosos (FERREIRA, 2005). Zardo (1989) encontrou uma maior concentração de proteína total após o pico da lactação ao avaliar os níveis metabólicos e sua variação em função do estado fisiológico de fêmeas bovinas (holandês x zebu). A albumina possui propriedades antioxidantes, impede a lipoperoxidação, evita danos ao DNA protegendo e formando complexos com radicais livres, tendo sido estabelecida relação entre os níveis de albumina e doenças cardiovasculares. Em algumas situações ela pode sofrer alterações funcionais, afetando assim a sua propriedade antioxidante, como por exemplo em pacientes com diabetes mellitus, que está associada a complicações vasculares (RIBAS et al., 2015).

#### 2.4.3 Aspartato aminotransferase (AST) e Gamaglutamiltransferase (GGT)

O fígado funciona em uma incrível variedade de processos biológicos essenciais à vida que incluem metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas, hormônios, e vitaminas, desintoxicação e excreção de resíduos e outras substâncias tóxicas, digestão (especialmente de gorduras), e produção da maioria dos fatores de coagulação (ALLISON, 2012). Aspartato aminotransferase (AST), anteriormente denominado soro transaminase glutâmica oxaloacética (TGO), está presente em maiores concentrações em hepatócitos e células musculares esquelético e cardíaco de todas as espécies e distintas isoenzimas de AST se encontram no citoplasma (BOYD, 1983).

Quando a lesão tecidual hepática é discreta, predomina no soro as isoenzimas provenientes do citoplasma. Entretanto, quando a lesão é intensa ocorre liberação de isoenzimas mitocondriais. Sua determinação tem sido empregada como meio auxiliar no diagnóstico de lesões neuromusculares em animais de grande porte (MOSS & HANDERSON 1998). A AST também é usada para avaliar condicionamento físico em animais de esportes. Também em suínos, pode ser indicador da capacidade de suportar estresse por transporte (teste do halotano), Bonelli et al. (2016) relataram que a atividade de AST em jumentas aumentou próximo ao parto e na lactação, pois exerce função importante na composição do leite.

Miranda (2011), em um estudo com 22 suínos de linhagens diferentes, observou um aumento nos níveis de AST e isso pode ser explicado por prováveis lesões na musculatura esquelética no momento do transporte do animal até o frigorífico ou até mesmo, no momento do abate ou por possíveis lesões decorrentes de doenças crônicas no fígado.



A GGT é uma enzima associada a tecidos como fígado, rins e intestino; sendo observadas elevações na sua concentração sérica em desordens hepáticas (TENNANT, 1997). A lesão hepática aguda, no entanto, pode produzir aumentos na atividade sérica da GGT, provavelmente devido à liberação de fragmentos de membrana aos quais a GGT está conectada (GORES et al, 1990). Embora a elevação da atividade de GGT indique disfunção hepática decorrente de colestase, deve-se considerar que tal significado clínico não deve ser considerado em neonatos, pois estudos dos constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos, revelaram que a atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT) foi mais elevada ao nascimento, diminuindo acentuadamente em função da idade. O acréscimo de GGT deve-se a sua transferência do colostro da mãe posteriormente, ao sangue do recém-nascido e a dosagem de GGT pode ser um teste útil na identificação indireta de bezerros neonatos hipogamaglobulinêmicos. (SILVA, 2004). Segundo alguns autores, a enzima está ligada ao metabolismo da glutatona, que tem um papel importante em todo o status antioxidante do organismo (KRAMER e HOFFMAN, 1997)

#### 2.4.4 Glicose

As concentrações de glicose no sangue dependem de múltiplos fatores de interação, incluindo o tempo desde a última refeição, influências hormonais e uso de glicose pelos tecidos periféricos, como o músculo esquelético. Os hormônios afetam a concentração de glicose no sangue regulando a produção hepática e o uso periférico de glicose (ALLISON, 2012). A insulina é um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo (CARVALHEIRA, 2002).

Žvorc et al. (2006) relataram que alterações na concentração de glicose que ocorrem durante a transição da gravidez para a lactação são o resultado de alterações fisiológicas nos processos metabólicos que ocorrem no início da lactação. Fornecimento de glicose e absorção pela glândula mamária são uma etapa limitante da síntese do leite. Acredita-se que a glicose independente de insulina diminui a captação nos tecidos, com exceção da glândula mamária, e

resistência à insulina em todo o corpo aumenta após o início da lactação (KOMATSU et al., 2005). Há evidências que a redução na concentração de insulina durante o balanço energético negativo representa uma diminuição dos efeitos estimulatórios da insulina sobre a secreção hipofisiária de LH, podendo alterar diretamente a função ovariana (TRIANA, 2012).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio pode não ser reduzido completamente, originando intermediários altamente reativos e danosos às células como radical hidropoxila ( $\text{HO}_2\bullet$ ), radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (FLOYD, 1984). A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição à fatores exógenos, contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1991). Radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do oxigênio, utiliza-se o termo "espécies reativas do oxigênio" (ERO) para se referir a eles (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Quando ocorrem eventos oxidativos adicionais, os sistemas pró-oxidantes podem aumentar com relação aos antioxidantes resultando em danos oxidativos, sendo caracterizado como estresse oxidativo. (SIES et al., 2005).

A primeira linha de defesa contra os danos oxidativos são os antioxidantes endógenos enzimáticos, o superóxido dismutase (SOD), a catalase e o sistema de glutatona, dentre elas, glutatona redutase (GSH-Rd) e glutatona peroxidase (GSH-Px). Há também os antioxidantes não enzimáticos que são lipossolúveis e hidrossolúveis (DALLAQUA; DAMASCENO, 2011), que são formados por muitas substâncias, entre elas, glutatona reduzida (GSH), tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e  $\beta$ -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre) e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina, (HALLIWELL et al., 2002).

O estresse oxidativo, leva à peroxidação lipídica de membranas celulares, que é causada pelo ataque de uma ERO (geralmente  $\bullet\text{OH}$ ), que abstrai um átomo de hidrogênio ( $\text{H}\bullet$ ) de um grupo metileno alílico, geralmente de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono (VASCONCELOS, et al., 2007). Para captar um elétron para sua

estabilização, estes radicais podem reagir com qualquer composto como proteínas, lipídios, açúcares, DNA entre outros, provocando uma reação em cascata que pode culminar em lesão e morte celular (HALLIWELL, 2007). Além de danos proteicos e em ácidos nucleicos, e um dos produtos finais desta reação é o malondialdeído (MDA) (FERNANDES, et al. 2012), que é um aldeído de cadeia curta. Sua formação ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (MAFRA et al., 1999), a peroxidação lipídica pode ser reconhecida como corpo estranho, desencadeando resposta antigênica com consequente produção de anticorpos. Esse processo cursaria com danos oxidativos aos eritrócitos o que, por sua vez, estimularia o recrutamento e ativação de mais fagócitos mononucleares, perpetuando os danos oxidativos (ANDRADE, 2010). Aumento da peroxidação e diminuição da proteção antioxidante geram epóxidos que espontaneamente reagem com centros nucleofílicos na célula e, assim, se ligam covalentemente ao DNA, RNA e proteínas. Tal reações podem levar à citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (AKTAN, 2003).

A glutatona reduzida (GSH) atua como transportadora e reservatório de cisteína, participa da detoxificação de agentes químicos e eliminação de produtos da lipoperoxidação, sendo também requisitada na síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A (GSH) é considerada um antioxidante multifuncional, está presente no plasma e principalmente nos eritrócitos e tem importância pelo fato de ser um dos índices da capacidade total antioxidante do corpo após o estresse oxidativo (FERNANDES, et al., 2012).

Indiretamente, as alterações induzidas pela ERO nas membranas celulares e componentes podem modificar as vias metabólicas, resultando em alterações fisiológicas e patológicas (MILLER et al., 1993). Causas patológicas de estresse oxidativo incluem toxemias, infecções, hipóxia/isquemia, hiperglicemia, metabolismo de xenobióticos, hiperlipidemia, hiperproteinemia, inflamação, reações imunes, fagocitose, estado hipermetabólico e câncer (MANDELKER, 2008). Entre as alterações fisiológicas, adaptações metabólicas verificadas no organismo da gestante conduzem a um aumento da taxa metabólica basal, do consumo de oxigênio e da formação de radicais livres, caracterizando-se este período como um estado de alto nível de estresse oxidativo (MALTA, et al., 2008).

Durante a gestação o estresse oxidativo ocorre com maior intensidade devido ao aumento do aporte de oxigênio e utilização de energia. Em mamíferos a placenta é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido a sua extensa divisão celular e alta atividade metabólica (LINS et al., 2017). Inicialmente a placenta, tem um ambiente hipóxico, à

medida que amadurece e sua vascularização se desenvolve, ele muda para um ambiente rico em oxigênio e sua massa mitocondrial abundante favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CASANUEVA E VITERI, 2003).

A placenta é a principal ligação materno-fetal, fornece proteção e imunidade ao feto e fornece oxigênio, hormônios e nutrientes da mãe para o feto, como por exemplo, ferro, cobre, ascorbato, cisteína / cistina necessária para a síntese de GSH. A placenta humana sintetiza a glutathione peroxidase extracelular e a secreta na circulação materna. Portanto, a produção de ERO placentária e as defesas antioxidantes devem estar em equilíbrio para uma gestação bem-sucedida (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2002). O estresse oxidativo pode ocorrer em várias situações em animais que são submetidos à produção incluindo as condições que são relevantes para a produção animal e bem-estar dos indivíduos (LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007).

A produção rentável requer um rápido aumento no peso corporal e na massa magra, aumentando a demanda sobre o sistema metabólico desses animais, o que pode levar, ao estresse oxidativo, a menos que sistemas antioxidantes sejam reforçados através da nutrição. Portanto é importante acompanhar as alterações metabólicas e fisiológicas que ocorrem com estes animais, a fim de diminuir as perdas econômicas da cadeia produtiva (ROSSI et al., 2013).

## 2.6 FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA (FOE).

O teste de FOE mensura a estabilidade dos eritrócitos em solução de cloreto de sódio em concentrações variáveis, que permite avaliar a resistência eritrocitária mínima (quando se inicia a hemólise), a resistência máxima (hemólise total) e a fragilidade corpuscular média, que corresponde à concentração de NaCl em que se observa 50% de hemólise (ESTEVES et al., 2007). A resistência depende da forma, volume, tamanho, conteúdo de hemoglobina e meia vida dos eritrócitos, e pode ser alterada por vários fatores fisiológicos ou patológicos (ELIAS, 2004).

A utilização dessa prova em hematologia clínica permitiu que fossem observadas variações dos resultados em enfermidades como algumas formas de anemia, alterações metabólicas e na avaliação da ação de algumas drogas sobre o sistema hematopoético (SANT'ANA, 2001). As alterações podem ocorrer em anemia hemolítica adquirida, alguns casos de anemia hemolítica secundária, após queimaduras graves, envenenamento químico e anemia hemolítica secundária, em alguns casos de linfoma maligno, leucemia, carcinoma, gestação e infecção (CAIRES, 2012). O tempo de vida da célula também é muito importante já

que os eritrócitos senescentes são mais frágeis que os jovens e correspondem a aproximadamente 30% da população eritrocitária (ELIAS, 2004).

Os eritrócitos são provavelmente as células mais expostas aos danos causados pela peroxidação pelas ERO. Os mecanismos pelos quais o eritrócito se defende contra o dano oxidativo são muito eficientes e estão localizados nos domínios do citosol e da membrana. A própria membrana contém vitamina E, o principal antioxidante que quebra a cadeia lipossolúvel (SUHAIL, et al., 2010).

Em estados infecciosos ocorre o envolvimento de EROS, aumento de peroxidação lipídica e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes naturais do organismo, consequentemente, a membrana eritrocitária se apresenta, mais frágil (WALLACH, 2003). As substâncias promotoras do estresse oxidativo são capazes de diminuir o tempo de vida dos eritrócitos circulantes, pela desnaturação das proteínas e peroxidação de lipídios da membrana eritrocitária (CAVDAR et al., 2003).

Asala et al. 2011, constataram que houve aumento na fragilidade osmótica eritrocitária em suínos que eram expostos ao sol por períodos prolongados, devido ao tempo de viagem. Pode ser atribuído aos efeitos concomitantes do calor e do estresse no transporte rodoviário, que têm demonstrado causar aumento na geração de radicais livres em animais, como resultado do estresse esgota o antioxidante na membrana eritrocitária, causando danos à proteína da membrana e ao lipídio, resultando em hemólise.



### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar marcadores de estresse oxidativo, fragilidade osmótica eritrocitária e parâmetros hematológicos e de bioquímica sérica em porcas gestantes inoculadas e não inoculadas com taquizoítos da cepa Nc1 de *Neospora. caninum*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Verificar a influência da inoculação de *N. caninum* em porcas gestantes nos parâmetros hematológicos.

Avaliar possíveis alterações nas funções renal e hepática e ocorrência de lesão hepática de porcas gestantes inoculadas com *N. caninum*

Avaliar o metabolismo oxidativo eritrocitário e a possibilidade de ocorrência de estresse oxidativo em porcas gestantes inoculadas com *N. caninum*.





## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – CEUA – CAV/UDESC, sob o protocolo n ° 7997170717.

### 4.1 LOCAL

As colheitas de amostras foram realizadas no setor de suinocultura do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), UDESC, em Lages/SC entre os meses de fevereiro a julho de 2018, onde os animais foram mantidos durante todo o período experimental e o processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), UDESC, em Lages/SC.

### 4.2 ANIMAIS

Foram selecionadas nove matrizes suínas hígidas, com peso médio de 130 kg, com 10 meses de idade, da linhagem comercial Agrocres Pic Camborough, como critério de seleção os animais deveriam ser soronegativos para *Toxoplasma gondii* e *N. caninum*. Os animais foram mantidos, em baias individuais, onde receberam alimentação e manejo de rotina. As matrizes foram separadas em três grupos de três animais cada. O grupo A foi mantido como controle (não inoculado) os animais dos grupos B, inoculadas 30 dias antes da gestação e o grupo C, aos 45 dias de gestação.

Para efeitos deste estudo foram considerados dois grupos, denominados de Com Neospora (CN) e Sem Neospora (SN), pois a avaliação estatística dos resultados obtidos dos grupos B e C tiveram comportamento semelhante e puderam ser agrupados como um só.

O inóculo foi constituído de 1 mL de solução salina com taquizoítos ( $2,6 \times 10^7$ ) da cepa Nc1 de *N. caninum* via intravenosa. As matrizes selecionadas eram primíparas e foram fertilizadas por meio de inseminação artificial conforme descrito por Oberlender et al., (2008), a gestação foi confirmada com o uso da ultrassonografia, sendo essa realizada aos 45 dias e repetida mensalmente para avaliar a manutenção da gestação e viabilidade fetal.

### 4.3 AMOSTRAS

Os momentos determinados para a realização da obtenção das amostras foram antes da inseminação e inoculação caracterizando o momento 0 e aos 45, 60, 80 e 100 dias de gestação para os dois grupos.

Amostras de sangue foram colhidas por venopunção da veia jugular. Foram obtidos 4 mL em tubo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). para realização do hemograma, 2 mL em tubos sem anticoagulante com ativador de coágulo para obtenção de soro para análises bioquímicas e 4 mL em tubos com heparina sódica para a análise da fragilidade osmótica eritrocitária e dosagem dos marcadores de estresse oxidativo GSH e MDA.

As amostras de soro foram diluídas com PBS na razão dois, com ponto de corte 1:50 (PARÉ et al., 1995).

### 4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

#### 4.4.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Foi feita a pesquisa de anticorpos IgG contra *N. caninum* em todas as amostras de sangue colhidas dos animais. Realizada pelo Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/UDESC.

#### 4.4.2 Hemograma

Após a colheita das amostras foram confeccionadas as extensões sanguíneas e coradas com corante hematológico rápido (LB, Laborclin). A contagem total de eritrócitos, contagem total de leucócitos e a dosagem de hemoglobina foram realizadas em contador automático (SDH-3 Vet, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil). A determinação do volume globular (VG) foi realizada pela técnica do microhematócrito e a partir destes valores foram calculados o volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) (JAIN, 1993). A contagem diferencial de leucócitos e avaliação morfológica foram realizadas nas extensões sanguíneas com o auxílio em microscopia óptica de luz.

#### 4.4.3 Análise bioquímica

Os tubos sem anticoagulante foram submetidos à centrifugação a 2000g por 10 minutos. O soro obtido da centrifugação foi armazenado e congelado a -20°C até a realização das dosagens. As dosagens bioquímicas foram realizadas por meio de kits comerciais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) específicos para cada análise em analisador automático (Labmax 27 Plenno, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil). Os testes bioquímicos realizados foram: ureia (Enzimático UV), creatinina (1010. Colorimétrico - Picrato alcalino - Jaffé), aspartato aminotransferase (AST) (Cinético - UV-IFCC), albumina (Colorimétrico - Verde de Bromocresol), globulinas (subtração do valor de albumina da PST), glicose (COD-Trinder), gama glutamiltransferase (GGT) (Szasz modificado). proteína sérica total (PST) (Colorimétrico - Biureto).

Para a determinação das concentrações de proteína plasmática total (PPT) foram realizadas por refratometria (Digit, Biosystems®).

#### 4.4.4 Metabolismo oxidativo

##### 4.4.4.1 Malondialdeído eritrocitário (MDA)

A concentração de MDA eritrocitário foi avaliada indiretamente pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Amostras de 4 mL de sangue contendo heparina sódica foram centrifugadas a 1000 g e foi obtido concentrado de eritrócitos após descartar o plasma e a camada de leucócitos. Realizaram-se três lavagens dos eritrócitos com solução isotônica tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 gelada. Para avaliar o MDA formado após a indução da lipoperoxidação foram utilizados 100 µL de eritrócitos, 800 µL de PBS e 100 µL de hidroperóxido de terc-butila (10 mM) e incubados em banho maria a 37°C por 60 min. Foi mensurada a concentração de hemoglobina utilizando 10 µL em 2,5 mL de reagente, antes da incubação para o MDA estimulado (JAIN, 1986). Em seguida, 1 mL de ácido tricloroacético a 28 % foi adicionado ao tubo, seguida de agitação e centrifugação a 1000 g por 15 min. Do sobrenadante obtido, foi retirada uma alíquota de 1 mL que foi acrescida de 100 µL de hidroxitolueno butilado (BHT), 500 µL de ácido tio barbitúrico a 1 % em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M e 500 µL de ácido clorídrico (HCl) a 25 % e incubados a 95°C por 15 min. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção do branco e do padrão, porém nestes, a amostra foi substituída por água deionizada e 1 µM de MDA, respectivamente. Após

resfriamento em banho de gelo foram adicionados 2 mL de n-butanol, que foram agitados e centrifugados a 1000 g por 15 min. Procedeu-se a leitura das densidades ópticas dos sobrenadantes a 532 nm por espectrofotometria, sendo o resultado expresso em nM MDA/g Hb.

#### 4.4.4.2 *Glutathiona reduzida eritrocitária (GSH)*

Para mensuração da GSH, 300 µL de sangue heparinizado foram hemolisados em 3 mL de água deionizada e 2 mL deste hemolisado foram utilizados para a dosagem da GSH. Do restante foi mensurada a hemoglobina utilizando 10 µL da amostra em 2,5 mL do reagente Drabkin (JAIN, 1986). Acrescentou-se 3 mL de solução precipitante contendo 1 g de EDTA, 8,35 g de ácido metafosfórico, 150 g de cloreto de sódio e 500 mL de água destilada. Homogeneizou-se e ficou em repouso por cinco minutos. Depois o tubo foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos. Foram utilizados 2 mL de água destilada e 3 mL de solução precipitante para obtenção do branco. Retirou-se 1 mL do sobrenadante e 1 mL do branco e acrescentado 4 mL da solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3M. Procedeu-se a leitura da absorbância a 412 nm para a obtenção do primeiro valor (V1). Após foi acrescentado 500 µL de DTNB e realizada a leitura novamente a 412 nm para obtenção do segundo valor (V2). Os valores foram submetidos à fórmula segundo método de Beutler (1984).

#### 4.4.5 Fragilidade osmótica eritrocitária

Para o teste de fragilidade osmótica eritrocitária 20 µL de sangue total com heparina sódica, foram acrescentados a 5,0 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) tamponada, com pH 7,4, nas seguintes concentrações: 0,85%, 0,80%, 0,75%, 0,70%, 0,65%, 0,60%, 0,55%, 0,50%, 0,45%, 0,40%, 0,35%, 0,30%, 0,25%, 0,20%, 0,10% e 0,00%. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 350g por 10 minutos, o sobrenadante foi lido por espectrofotometria a 546 nm contra água deionizada, de acordo com a técnica proposta por Parpart et al. (1947). O resultado deste teste expressa a concentração de NaCl correspondente a 50% de hemólise (H50), calculado a partir da curva dos percentuais de hemólise nas concentrações, ajustada por um modelo linear generalizado para as proporções com função de ligação Probit (McCULLOCH e SEARLE, 2001).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram tabulados e analisados com auxílio do programa computacional Sigma Plot Versão 12.0 e comparados entre os grupos e momentos. O teste de normalidade utilizado para avaliar os dados obtidos em cada grupo foi o Shapiro-Wilk. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo método de análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).

Após a inoculação da cepa Nc1 de *N. caninum*, todas as porcas apresentaram soroconversão com título de (IgG) positivos após o quinto dia de inoculação. Os maiores títulos de IgG, em todos os grupos inoculados, foram verificados entre os 14 e 28 DPI, sendo que na maioria dos animais esses valores decresceram após o 28 DPI, mantendo-se constante durante a gestação

### 5.2 HEMOGRAMA.

O período gestacional promoveu alterações no eritrograma mais especificamente em hematócrito. Os valores basais (dia 0) do hematócrito de ambos os grupos com neospora (CN) e sem neospora (SN), foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) do dia 45, 60, 80 e 100 (tabela 1) e não houve diferença estatística entre os grupos CN e SN. Apesar dos valores de eritrócitos e hemoglobina não apresentarem diferença estatística, houve uma diminuição quando se observa as médias no decorrer da gestação em comparação com os valores basais e, no período final um discreto aumento, porém sem ultrapassar os limites de referência.

Tabela 1 Valores médios  $\pm$  desvio padrão do eritrograma de matrizes suínas inoculadas com *N. caninum* (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.  $P < 0,05$ .

Parâmetros	Dias de gestação						Referência*
	Grupos	0	45	60	80	100	
<b>Eritrócitos</b> ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	CN	$7,69 \pm 0,55$	$6,8 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,7$	$7,4 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,3$	5,0 – 8,0
	SN	$8,18 \pm 0,66$	$7,2 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,5$	
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	CN	$12,8 \pm 1,0$	$11,8 \pm 0,4$	$12,1 \pm 0,6$	$12,7 \pm 0,6$	$12,1 \pm 1,2$	10 – 16
	SN	$14,0 \pm 1,0$	$12,5 \pm 0,7$	$13,2 \pm 0,6$	$12,8 \pm 0,7$	$13,1 \pm 0,9$	
<b>Hematócrito</b> (%)	CN	$41,1 \pm 3,3^{\text{aA}}$	$36,4 \pm 1,2^{\text{bA}}$	$36,8 \pm 2,3^{\text{bA}}$	$38,3 \pm 1,0^{\text{bA}}$	$38,0 \pm 1,6^{\text{bA}}$	32 – 50
	SN	$43,0 \pm 2,0^{\text{aA}}$	$38,5 \pm 2,1^{\text{bA}}$	$38,0 \pm 1,5^{\text{bA}}$	$37,0 \pm 2,0^{\text{bA}}$	$38,0 \pm 2,6^{\text{bA}}$	
<b>VGM (fL)</b>	CN	$51,0 \pm 4,2$	$52,9 \pm 2,5$	$54,2 \pm 3,3$	$51,8 \pm 2,2$	$51,6 \pm 1,0$	50 – 68
	SN	$52,6 \pm 2,3$	$52,9 \pm 1,2$	$52,1 \pm 0,9$	$51,3 \pm 1,0$	$51,8 \pm 0,3$	
<b>CHGM (%)</b>	CN	$32,7 \pm 1,4$	$32,8 \pm 1,7$	$32,8 \pm 1,1$	$33,3 \pm 2,0$	$33,1 \pm 1,3$	30 – 34
	SN	$32,6 \pm 1,1$	$32,4 \pm 0,04$	$34,5 \pm 2,1$	$34,6 \pm 0,1$	$34,5 \pm 0,1$	
<b>RDW</b>	CN	$17,7 \pm 0,7$	$17,1 \pm 0,8$	$17,9 \pm 0,7$	$17,7 \pm 0,7$	$17,7 \pm 0,6$	
	SN	$17,9 \pm 0,5$	$16,7 \pm 0,6$	$16,5 \pm 0,2$	$17,2 \pm 0,3$	$17,3 \pm 0,4$	

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma linha significa diferença estatística entre os momentos.

<sup>AB</sup> Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença estatística entre os grupos.

VGM: Volume Globular Médio. CHGM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. RDW: Red Cell Distribution Width. \*Jain (1993). Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Eze et al. (2010) fizeram avaliação hematológica de 114 suínos saudáveis, e foram observados valores basais de eritrócitos, hemoglobina e volume globular semelhantes ao encontrado no presente estudo, apoiando para confirmar as alterações durante o período gestacional.

De acordo com Souza et al. (2002) inúmeros ajustes fisiológicos e anatômicos ocorrem durante a gestação, há um aumento do volume sanguíneo total, porém a massa eritrocitária não é proporcional ao aumento de volume plasmático. O volume plasmático se eleva a partir da sexta semana de gestação, cerca de 50 %, aumentando durante todo o período gestacional, como pode ser observado no dia 45, com uma redução de hematócrito já indicando o início da hemodiluição. A massa eritrocitária também se eleva em média 30 %, mas em proporções menores, ocorrendo uma hemodiluição e consequentemente uma diminuição do volume globular. A hemodiluição, muitas vezes, leva a resultados de anemia incorretos, sendo que esta pseudo-anemia não apresenta alterações nos eritrócitos porque decorre do aumento do volume plasmático e surge mesmo quando existem reservas nutricionais adequadas (de ferro, ácido fólico e vitamina B12).

Thorn (2010) observou em suínos que alterações hematológicas ocorrem com a gestação, parto e lactação, aproximadamente duas semanas antes do parto, os parâmetros de eritrócitos nos suínos diminuem e continuam até o final da lactação. Žvorc et al. (2006) realizaram um estudo com 240 suínos, em que avaliou parâmetros hematológicos em épocas gestacionais alternadas e observou que a contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito foram significativamente diminuídos durante a gestação.

Gravena et al. (2010) em um estudo com jumentas gestantes, observaram um aumento nos níveis de eritrócitos, VGM e hemoglobina, no período final da gestação.

O qual se assemelha ao presente estudo, em que há uma diminuição na série eritrocitária e de índices hematimétricos nas fases iniciais da gestação devido à hemodiluição, mas no decorrer dos dias se observa um aumento gradativo. Souza et al. (2002) descreveram que o crescimento fetal, com subsequente aumento da taxa metabólica e maior demanda de oxigênio estimula a liberação de eritropoetina pelo tecido renal, com consequente aumento no número de eritrócitos circulantes.

Gebauer et al. (2005) em um estudo com 60 mulheres grávidas das mais variadas idades, constataram que os valores reduzidos de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito estão



relacionados com a progressão da gestação. Barber et al. (1996) afirmaram que testes hematológicos de rotina não são úteis para o diagnóstico de neosporose e geralmente não apresentam alterações.

Desta forma, provavelmente as alterações ocorridas no hemograma, sejam atribuídas somente à gestação e não à neosporose.

### 5.3 LEUCOGRAMA

Quanto aos valores de leucograma não houve diferença estatística e os valores se mantiveram nos limites de referência (JAIN, 1993).

Tabela 2 Valores médios  $\pm$  desvio padrão do leucograma de matrizes suínas inoculadas com *N. caninum* (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.

Parâmetros	Dias de gestação						Referência*
	Grupos	0	45	60	80	100	
<b>Leucócitos</b> (/ $\mu$ L)	CN	18300 $\pm$ 1515	18831 $\pm$ 3105	18122 $\pm$ 4135	16773 $\pm$ 2150	15275 $\pm$ 2899	11000 – 22000
	SN	19296 $\pm$ 902	1772 $\pm$ 1838	18105 $\pm$ 2441	16743 $\pm$ 483	15057 $\pm$ 3301	
<b>Bastonetes</b> (/ $\mu$ L)	CN	60 $\pm$ 147	171 $\pm$ 162	0 $\pm$ 0	32 $\pm$ 78	29 $\pm$ 71	0 – 800
	SN	61 $\pm$ 107	63 $\pm$ 98	122 $\pm$ 108	57 $\pm$ 99	38 $\pm$ 65	
<b>Segmentados</b> (/ $\mu$ L)	CN	6945 $\pm$ 2335	7322 $\pm$ 2908	6129 $\pm$ 2787	7282 $\pm$ 938	6392 $\pm$ 2042	3200 – 10000
	SN	6615 $\pm$ 299	6069 $\pm$ 999	7062 $\pm$ 816	7537 $\pm$ 431	6821 $\pm$ 3102	
<b>Linfócitos</b> (/ $\mu$ L)	CN	9641 $\pm$ 2485	9828 $\pm$ 2850	9640 $\pm$ 2374	7442 $\pm$ 1310	7371 $\pm$ 2282	4500 – 13000
	SN	11336 $\pm$ 1092	9579 $\pm$ 2880	9418 $\pm$ 2351	7642 $\pm$ 265	6747 $\pm$ 2122	
<b>Eosinófilos</b> (/ $\mu$ L)	CN	1186 $\pm$ 607	1018 $\pm$ 435	1308 $\pm$ 1541	1336 $\pm$ 773	733 $\pm$ 584	250 – 2000
	SN	505 $\pm$ 275	1186 $\pm$ 1403	794 $\pm$ 554	1002 $\pm$ 146	1019 $\pm$ 356	
<b>Basófilos</b> (/ $\mu$ L)	CN	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 – 400
	SN	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	
<b>Monócitos</b> (/ $\mu$ L)	CN	465 $\pm$ 221	490 $\pm$ 407	1043 $\pm$ 531	679 $\pm$ 298	742 $\pm$ 460	250 – 2000
	SN	777 $\pm$ 229	825 $\pm$ 637	708 $\pm$ 88	504 $\pm$ 181	432 $\pm$ 285	

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

\* Jain (1993).

Calzada et al. (2001) realizaram um estudo com 30 vacas positivas para *N. caninum* e 10 negativas e também não observaram diferença estatística nos valores de leucograma entre os grupos. Os autores relataram ainda que o fato de não haver casos de leucocitose ou neutrofilia em animais positivos aos anticorpos anti-*Neospora caninum* reforça as hipóteses de que os taquizoítos, que são as fases de multiplicação rápida do parasita, e que estão presentes em

animais infectados de forma crônica, localizam-se em seus tecidos latentes sem causar qualquer resposta inflamatória refletida no hemograma. Yakhchali, et al. (2017), em um estudo com 137 cães de rua, infectados com *Neospora caninum*, em que 12,41% foram positivos, não observaram diferenças nos valores de leucócitos e números de eosinófilos em comparação com os animais negativos, resultado que o presente estudo apresenta semelhança.

Gebauer et al. (2005) descreveram que existe uma resposta inespecífica no comportamento das células da série leucocitária no organismo materno, porém, favorável ao desenvolvimento do feto. O aumento dos neutrófilos segmentados na gestante garantiria o desenvolvimento seguro do feto, protegendo-o durante todo o período. Já os neutrófilos bastonetes, precursores dos neutrófilos segmentados, aumentariam devido à maturação incompleta dessas células em função da demanda requerida. Sarafana, et al. (2007) descreveram os resultados de um estudo da resposta imunológica durante a gestação de mulheres, em que os monócitos são ativados na gravidez, e diversos produtos solúveis produzidos pela placenta ativam os monócitos e suprimem a proliferação de linfócitos *in vitro*.

#### 5.4 PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL E PLAQUETAS

Não houve diferença estatística e os valores se mantiveram nos limites de referência na proteína plasmática total e plaquetas (JAIN, 1993).

Tabela 3 Valores médios  $\pm$  desvio padrão da contagem de plaquetas e mensuração de PPT de matrizes suínas inoculadas com *N. caninum* (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.

Parâmetros	Dias de gestação						Referência*
	Grupos	0	45	60	80	100	
<b>Plaquetas</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	CN	299 $\pm$ 50	387 $\pm$ 39	309 $\pm$ 98	302 $\pm$ 34	243 $\pm$ 58	100 - 900
	SN	287 $\pm$ 165	269 $\pm$ 30	302 $\pm$ 5,8	260 $\pm$ 58	268 $\pm$ 28	
<b>PPT (g/dL)</b>	CN	7,3 $\pm$ 0,6	7,0 $\pm$ 0,7	7,3 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 0,5	7,4 $\pm$ 0,2	6,0 – 9,1
	SN	7,4 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,2	7,4 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,1	

Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

PPT: Proteína Plasmática Total.

\* Jain (1993).

O grupo de proteínas plasmáticas exerce importante papel nos mecanismos de regulação plasmática e transporte de fluídos intra e extracelular. Porém, a concentração das proteínas plasmáticas está na dependência do balanço hormonal, estado nutricional, balanço hídrico e estados de prenhez, parição e lactação (VANNUCCHI et al. 2016).

Andreazzi et al. (2015) realizaram um estudo com 16 éguas gestantes, e observaram um aumento de  $4,99 \pm 0,66$  para  $6,38 \pm 1,62$  g/dL, nos valores de proteína plasmática total, mas estes valores permaneceram dentro dos parâmetros normais de referência. Alguns autores relataram não terem identificado diferença nas concentrações de proteínas plasmáticas totais no período inicial, médio e final da gestação em éguas (PENTEADO et al., 1999). Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho.

## 5.5 BIOQUÍMICA CLÍNICA

Na avaliação bioquímica, os valores de creatinina foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Nos dias 0 e no dia de 45 (com e sem neospora), os valores de creatinina foram estatisticamente iguais, diferindo dos valores de creatinina dos dias 80 e 100 (com e sem neospora), os quais apresentaram redução. O dia 60 diferiu de todos os outros momentos. O momento basal de AST diferiu de todos os outros momentos independentes do grupo estudado. Sendo que não foi observado diferenças estatísticas entre os grupos com e sem neospora. Os valores referentes às dosagens dos analitos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4- Valores médios  $\pm$  desvio padrão de bioquímica clínica sanguínea de matrizes suínas inoculadas com *N. caninum* (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação  $P < 0,05$ .

Analitos	Dias de gestação						Referência*
	Grupos	0	45	60	80	100	
Ureia (mg/dL)	CN	27,8 $\pm$ 7,1	25,1 $\pm$ 5,7	25,6 $\pm$ 4,8	31,8 $\pm$ 6,3	32,6 $\pm$ 3,2	21,4 – 64,2
	SN	26,3 $\pm$ 4,6	23,3 $\pm$ 5,5	24,4 $\pm$ 2,5	27,6 $\pm$ 2,0	37,5 $\pm$ 2,1	
Creatinina (mg/dL)	CN	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	2,5 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	2,1 $\pm$ 0,4 <sup>abA</sup>	1,8 $\pm$ 0,4 <sup>bA</sup>	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>bA</sup>	1,0 – 2,7
	SN	2,6 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	2,6 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	2,0 $\pm$ 0,1 <sup>abA</sup>	1,4 $\pm$ 0,2 <sup>bA</sup>	1,4 $\pm$ 0,1 <sup>bA</sup>	
PST (g/dL)	CN	7,0 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,4	6,7 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,3	7,9 – 8,9
	SN	7,1 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,1	6,8 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,1	
Albumina (g/dL)	CN	3,0 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,1	1,9 – 3,9
	SN	3,3 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,2	
Globulinas (g/dL)	CN	4,0 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 1,9	3,8 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,4	5,3 – 6,4
	SN	4,0 $\pm$ 0,3	3,4 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,1	
GGT (U/L)	CN	36,0 $\pm$ 10,0	35,0 $\pm$ 12,1	34,1 $\pm$ 5,9	34,6 $\pm$ 8,3	37,0 $\pm$ 10,8	10 – 60
	SN	39,3 $\pm$ 11,7	34,3 $\pm$ 9,3	36,0 $\pm$ 3,0	31,6 $\pm$ 3,2	35,0 $\pm$ 16,9	
AST (U/L)	CN	83,3 $\pm$ 12,0 <sup>aA</sup>	24,1 $\pm$ 1,3 <sup>bA</sup>	20,0 $\pm$ 4,6 <sup>bA</sup>	20,4 $\pm$ 6,7 <sup>bA</sup>	21,1 $\pm$ 5,2 <sup>bA</sup>	32 – 84
	SN	90,3 $\pm$ 6,8 <sup>aA</sup>	27,0 $\pm$ 8,0 <sup>bA</sup>	24,5 $\pm$ 5,5 <sup>bA</sup>	22,6 $\pm$ 3,2 <sup>bA</sup>	27,0 $\pm$ 9,8 <sup>bA</sup>	
Glicose (mg/dL)	CN	76,3 $\pm$ 12,1	85,6 $\pm$ 13,0	83,1 $\pm$ 12,0	102,1 $\pm$ 31,4	94,3 $\pm$ 29,2	85 - 150
	SN	75,6 $\pm$ 16,7	75,6 $\pm$ 5,5	84,5 $\pm$ 11,5	92,3 $\pm$ 12,3	113,0 $\pm$ 12,7	

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma linha significa diferença estatística entre os momentos.

<sup>AB</sup> Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença estatística entre os grupos.

PST: Proteína Sérica Total. GGT: Gama Glutamyltransferase. AST: Aspartato Aminotransferase.

\*Kaneko et al. (2008). Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A formação e a excreção constante de creatinina fazem dela um marcador da função renal muito importante, principalmente da filtração glomerular. A creatinina plasmática, assim como a ureia, é utilizada na investigação de afecções renais. Isto porque seus níveis não sofrem influência de fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismo proteico, se tornando um marcador de função renal mais seguro que a ureia (THRALL, 2015).

Verheyen et al. (2006) em um estudo com 200 suínos, afirmaram que a interpretação dos níveis de ureia e creatinina é dificultada nos períodos pré e pós-parto, devido às mudanças na taxa de filtração glomerular, além da massa muscular que pode sofrer variações, tendo efeitos sobre os níveis desses metabólitos. E observaram uma concentração sérica crescente de ureia a partir de três semanas antes do parto até três semanas após o parto em porcas em período final de gestação. Duncan et al. (1994) confirmaram que as elevações de ureia no soro são indicativos de azotemia ou uremia, que pode ter causas renais, pré e pós-renais. A redução no valor de ureia pode indicar insuficiência hepática ou de processo infeccioso grave. Em éguas gestantes foi

observado aumento significativo de níveis séricos de creatinina (ANDREAZZI et al. 2015). Contudo, quando os valores foram comparados aos padrões de referência, estavam dentro dos valores normais.

Campelo (2018) descreve que a fosfocreatina sendo uma fonte de liberação rápida de energia é mobilizada quando aumenta a atividade metabólica, mas devido à diminuição de exercícios físicos realizados por animais em período gestacional, ocorre uma redução nos níveis de creatinina. O que se assemelha quando comparamos os dias 0 até o final da gestação, em que foi notada diminuição gradual, mas dentro dos valores de referência. Marques et al. (2010) relataram que alterações hemodinâmicas, como a hemodiluição por aumento do volume plasmático circulante e a hiperfiltração renal, resultam na diminuição plasmática da creatinina sérica. Portanto, valores de creatinina considerados normais em mulheres não gestantes, podem refletir uma função renal anormal durante a gestação, para a mulher grávida. Em contrapartida, Castillo et al. (2004) observaram aumento nos níveis de creatinina no período final da gestação em vacas, atribuindo esses dados ao aumento da musculatura fetal e do dano muscular na mãe.

Os principais testes indicadores de metabolismo proteico em um perfil metabólico são as proteínas totais, a albumina, a globulina e a ureia (GUYTON e HALL, 2002). Não foi constatada diferença estatística, o perfil proteico é modificado em função do estabelecimento dos embriões e para manutenção dos processos de gestação e lactação (JAIN, 1993). Nos estágios finais da gestação, a concentração das proteínas totais decresce com o movimento das proteínas sanguíneas para a glândula mamária, particularmente para a formação do colostro (VANNUCCHI et al. 2016). Verheyen et al. (2006) observaram valores reduzidos de imunoglobulinas em porcas no período final da gestação, alegaram que o nível sérico de imunoglobulina diminui no soro da porca até o dia do parto devido à produção de colostro.

A prenhez, assim como a lactação constituem condições nas quais ocorre grande atividade metabólica no organismo a qual, por consequência, se reflete sobre as variáveis sanguíneas. A atividade de aminotransferases no sangue é muito importante porque elas atuam como catalizadores de reações que transformam aminoácidos em carboidratos (MILINKOVIC-TUR et al. 2005). Acredita-se que no final da gestação, período no qual há grande crescimento fetal a atividade metabólica esteja intensamente voltada para a constituição dos tecidos fetais com os aminoácidos sendo destinados à constituição proteica dos diferentes tecidos, com consequente diminuição do AST (CAMPELO, 2008), os valores de AST no presente estudo tiveram uma diminuição a partir do primeiro mês de gestação, podendo ser observado estas alterações quando se compara os valores basais para os demais dias de gestação.

Bezerra et al. (2016) relataram que a albumina é uma proteína que se encontra ligada a vários constituintes no plasma, dentre eles a bilirrubina. Essa ligação forma um complexo que é considerado um dos antioxidantes naturais dos fluidos extracelulares, quanto maior for o teor de proteína na dieta de suínos maior será a estimulação do sistema antioxidante não enzimático por meio dessa interação. Os níveis de albumina no presente estudo estão em todos os períodos de gestação dentro dos valores de referência, indicando um nível nutricional adequado, podendo também ter contribuído para regular o sistema antioxidante.

Em um relato de caso, de um cão com um diagnóstico clínico laboratorial de infecção por *Babesia canis*, *Ehrlichia spp.* associado a resposta sorológica para *Neospora caninum*, Leal et al. (2012) observaram um aumento nos níveis de AST e GGT e descreveram que este aumento nos valores provavelmente ocorreram por esplenomegalia e hepatomegalia causada em decorrência da ehrlichiose, babesiose e neosporose, devido à lesões hepáticas por ação patogênica de um ou mais agentes envolvidos neste relato.

Tavares et al. (2013) relatam em um estudo de aspectos clínicos e epidemiológicos sobre *Neospora caninum*, que exames bioquímicos se apresentam inespecíficos para o agente em questão.

## 5.6 METABOLISMO OXIDATIVO ERITROCITÁRIO

Houve diferença estatística para os valores de MDA do dia 60 sem neospora para todos os outros momentos, o grupo com neospora obteve diferença entre o dia 60 e o dia 100, os valores de GSH para o grupo sem neospora o dia 100 foi diferente de todos os outros momentos. Além disso houve diferença estatística entre os grupos CN e SN no período final da gestação para MDA e durante a gestação para GSH. (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios  $\pm$  desvio padrão de Malondialdeído (MDA) e Glutathiona Reduzida (GSH) de matrizes suínas inoculadas com *N. caninum* (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.  $P < 0,05$ .

		Dias de gestação				
	Grupos	0	45	60	80	100
<b>Malondialdeído (<math>\mu\text{mol/g Hb}</math>)</b>	CN	0,57 $\pm$ 0,26 <sup>abA</sup>	0,49 $\pm$ 0,19 <sup>abA</sup>	1,18 $\pm$ 1,00 <sup>bA</sup>	0,47 $\pm$ 0,16 <sup>abA</sup>	0,31 $\pm$ 0,13 <sup>aA</sup>
	SN	0,69 $\pm$ 0,46 <sup>abA</sup>	0,68 $\pm$ 0,34 <sup>abA</sup>	2,76 $\pm$ 1,07 <sup>cB</sup>	0,22 $\pm$ 0,11 <sup>abA</sup>	0,87 $\pm$ 0,23 <sup>abB</sup>
<b>Glutathiona reduzida (<math>\mu\text{mol/g Hb}</math>)</b>	CN	1,87 $\pm$ 1,00 <sup>aA</sup>	3,3 $\pm$ 1,73 <sup>aA</sup>	2,57 $\pm$ 0,95 <sup>aA</sup>	2,58 $\pm$ 1,10 <sup>aA</sup>	2,91 $\pm$ 0,13 <sup>aA</sup>
	SN	0,48 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup>	1,22 $\pm$ 0,75 <sup>ab</sup>	1,72 $\pm$ 1,03 <sup>aA</sup>	0,94 $\pm$ 0,79 <sup>ab</sup>	5,88 $\pm$ 3,30 <sup>bb</sup>

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma linha significa diferença estatística entre os momentos.

<sup>AB</sup> Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Bercjieri-Ronchi et al. (2011) em estudo observaram que o aumento das cargas metabólicas em porcas durante o final da gestação e lactação causam estresse oxidativo sistêmico durante esses importantes períodos. O aumento do estresse oxidativo também está relacionado à menor disponibilidade de antioxidantes durante o final da gestação e lactação, e começa a normalizar no final do período de lactação.

Durante a gestação, há uma alta demanda de energia e um aumento na necessidade de oxigênio, o que favorece um estado de estresse oxidativo devido à superprodução de espécies reativas de oxigênio (AGARWAL et al., 2003). No terço final há um aumento da taxa metabólica, necessária para suprir o rápido crescimento fetal e a preparação para o parto. Concomitantemente ao aumento do metabolismo, há maior demanda de oxigênio, que estimula uma resposta adaptativa na qual ocorre aumento da concentração de Hb, elevando, dessa forma, a quantidade de oxigênio transportado (GRAVENA et al., 2010)

Zhao et al. (2014), após compararem porcas com características dominantes e submissas, tiveram maior concentração de carbonila (marcador de estresse oxidativo) durante o final da gestação e lactação, indicando que porcas dominantes receberam maior dano oxidativo durante o final da gestação e lactação. O aumento do dano oxidativo às proteínas celulares pode causar modificação química de proteínas, e morte celular o que poderia contribuir para a diminuição do tamanho da ninhada (SIMM E BRÖMME, 2005). Cancelier, (2017) em relação aos valores de MDA sérico observou diferença estatística entre os grupos de éguas vazias e éguas gestantes o que indica que há maior estímulo à produção de ERO e consequentemente aos danos oxidativos nessas condições.

Tonin et al. (2014) após inoculação de *N. caninum* em gerbils, analisaram o tecido cerebral e constataram um aumento nos níveis de GSH e MDA em relação ao grupo controle, como também foi constatado pelo presente projeto, quando se observa as médias maiores de GSH e menores de MDA no grupo que contém neospora.

Erisir et al. (2009) mostraram que as concentrações de MDA no segundo e terceiro meses de gestação em ovelhas mostraram menores do que no primeiro, quarto e quinto meses de gestação, já as concentrações de GSH e as atividades de GSH-Px durante a gestação aumentaram, sendo que foram maiores no segundo e terceiro meses de gestação, quando comparados com ovelhas não gestantes, e explicam que a diminuição plasmática de MDA no período de gestação ocorre devido ao aumento das concentrações de GSH e a atividade da GSH-Px, que desempenham importante papel de desintoxicação e eliminação das ERO.

## 5.6 FRAGILIDADE OSMÓTICO ERITROCITÁRIA (FOE)

Os valores da concentração de NaCl em que houve 50% de hemólise estão expostos na tabela 6 e os valores da fragilidade osmótica eritrocitária estão demonstrados nos gráficos 1 e 2. Não foi observada diferença estatística entre os grupos e os momentos estudados.

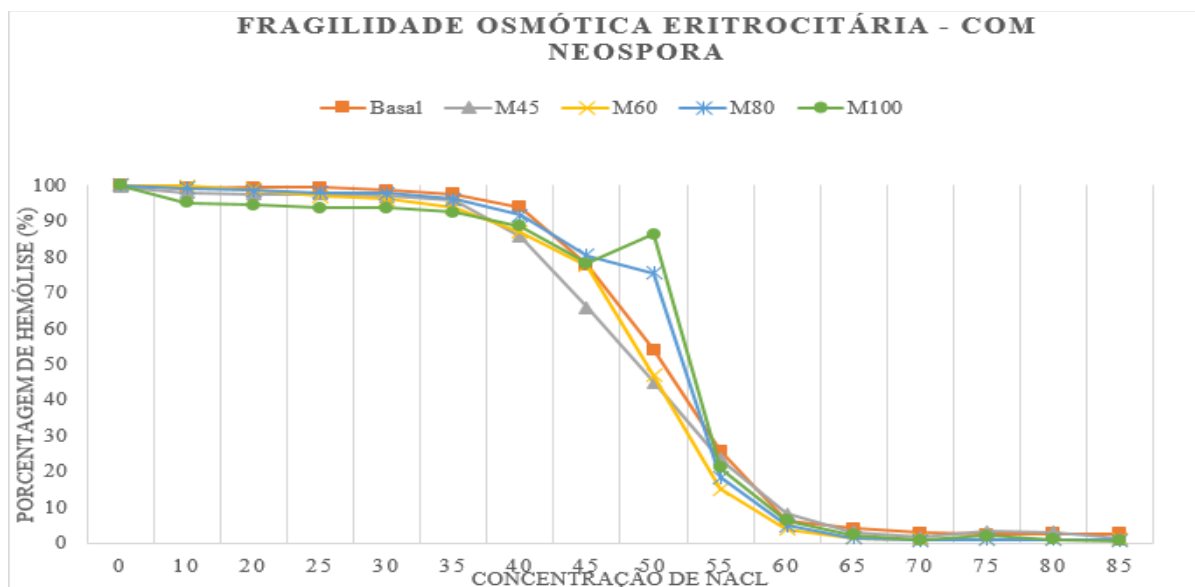
Tabela 6 Valores médios  $\pm$  desvio padrão da fragilidade osmótica eritrocitária de matrizes suínas inoculadas com *N. caninum* (CN) e sem inoculação (SN) aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.

		Dias de gestação				
Grupos		0	45	60	80	100
Hemólise em 50%	CN	0,53 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,06
	SN	0,55 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,05

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre momentos.

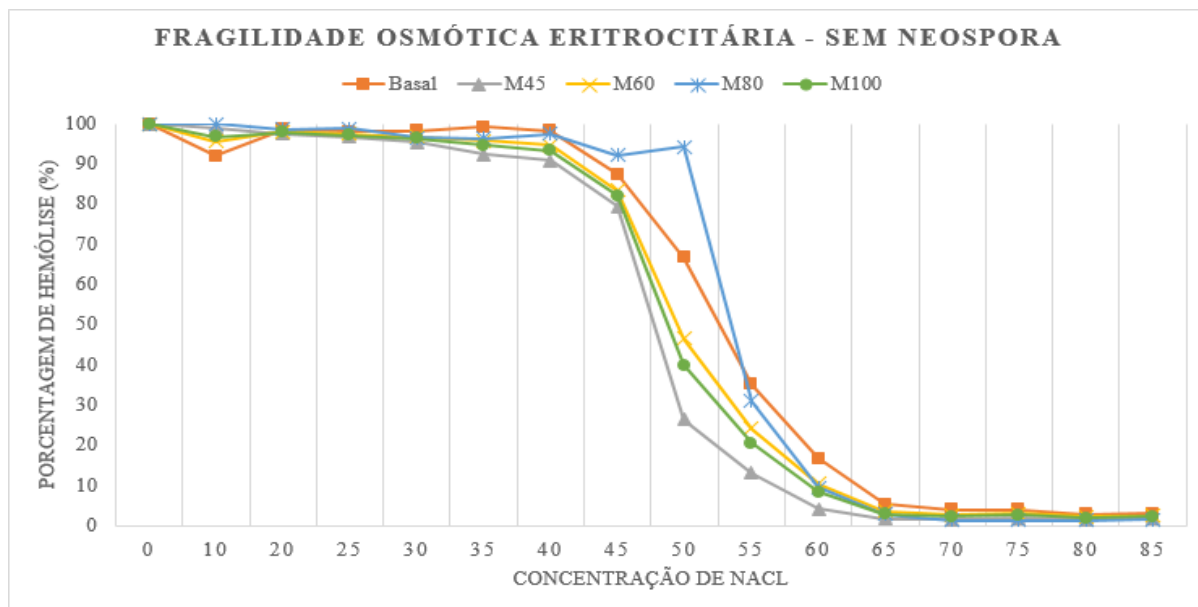
Gráfico 1 - Fragilidade osmótica eritrocitária, de matrizes suínas com neospora, aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.



Gráfico 2 Fragilidade osmótica eritrocitária, de matrizes suínas sem neospora, aos 0, 45, 60, 80 e 100 dias de gestação.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Durante a gravidez foi reportado aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos (MAGID et al., 1982), a qual se mostrou ser mais intensa em mulheres no último trimestre da gravidez (RODRIGUES, 2009) e Kadah et al. (2014) também observaram uma tendência da FOE em vacas gestantes, porém, constataram que em vacas no período lactação a FOE é ainda maior, e sugerem que durante a gestação e lactação ocorre maior produção de oxidantes capazes de danificar a membrana dos eritrócitos, tornando-os mais frágeis nesses períodos, no momento em que está ocorrendo o estresse oxidativo, há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) no corpo a um nível que supera os sistemas de defesa antioxidante (FEREIRA E MATSUBARA, 2007).

O mecanismo do dano envolve a peroxidação lipídica, que destrói as membranas celulares com a liberação de componentes intracelulares, como as enzimas lisossômicas, levando a mais danos nos tecidos. As ERO desempenham um papel vital no dano celular e nos tecidos e demonstraram ter efeitos adversos sobre os eritrócitos (ADENKOLA et al., 2010).

Não foi observada diferença estatística para fragilidade osmótica eritrocitária no presente estudo, mas foi observado uma maior fragilidade nos períodos finais da gestação, para os dias 80 e 100 do grupo sem neospora.



## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com a metodologia adotada pôde-se concluir que as alterações hematológicas e bioquímicas foram previsíveis para o período gestacional, sem influência direta, da infecção por *Neospora caninum*. O estresse oxidativo discreto ocorrido no período gestacional, indicado pelo aumento de MDA, assim como o aumento da produção de GSH também entre grupos, demonstrou ser mais sensível ao inóculo.

Apesar da importância da neosporose na economia, não observamos alterações em exames laboratoriais de rotina. Possibilitando concluir que são necessários mais estudos para elucidar a importância desta infecção em rebanhos suínos e a necessidade de inclusão de testes para detecção da mesma.



## 7 REFERÊNCIAS

ADENKOLA, A. Y.; AYO, J. O.; SACKKEY, A. K. B. et al. Erythrocyte osmotic fragility of pigs administered ascorbic acid and transported by road for short-term duration during the harmattan season. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, 2010.

AGARWAL, A.S. RA and BEDAIWY MA 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79, 829–843.

AKTAN, Bülent.; TAYSI, S.; GUMUSTEKIN, K.; et al. Evaluation of oxidative stress in erythrocytes of guinea pigs with experimental otitis media and effusion. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 33, n. 2, p. 232-236, 2003.

ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C.; HOFFMAN, R.L. A survey of causes of bovine occurring in the San Joaquin Valley, California. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.2, p.283-287, 1990.

ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C, BARR, B.C. et al. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in california dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.198, p.241-244, 1991.

ANDRADE, A. Z. de, RODRIGUES, J. K.; DIB, L. A. Marcadores séricos de estresse oxidativo em mulheres inférteis com endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 6, p. 279-285, 2010.

ANDRADE, G. N. de; ARAÚJO, D. A. C.; ANDRADE, A. T. L. Alterações dos estoques de ferro durante a gestação na mulher brasileira pela medida da ferritina sérica. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 106, n. 9, p. 345- 49, set. 1996.

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, 2003.

ASALA, O. O. AYO, J. O., REKWOT, P. I. et al. Effect of ascorbic acid administration on erythrocyte osmotic fragility of pigs transported by road during the hot-dry season. **Veterinary research communications**, v. 35, n. 4, p. 245-254, 2011.

AZEVEDO, S. S.; Pena, H. F. D. J.; ALLVEZ, C. J. Prevalence of anti-Toxoplasma gondii and anti-Neospora caninum antibodies in swine from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 80-84, 2010.

BARBER, J.S., TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Veterinary Record**, v.139, p.439-443, 1996.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. de Lima. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. 2006.

BEUTLER, E. Glutathione. In: \_\_. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods** 3 ed. Orlando: Grune e Stratton, p.131-134, 1984.

BIELSA, J. Muñoz; ROMERO, J. J.; HEUER, C. Controle de neosporose em bovinos com Bovilis Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 34-37, 2004.

BISPO, D.L.N.; PEREIRA, O.C.M. Importância do conhecimento das alterações induzidas pelo estresse em animais domésticos. *Interciência*, Venezuela, v. 19, n. 2, p. 72-74, 1994.

BONELLI, F. ROTA, A.; CORAZZA, M. et al. Hematological and biochemical findings in pregnant, postfoaling, and lactating jennies. *Theriogenology*, v. 85, n. 7, p. 1233-1238, 2016.

BOYD, J. W. The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 12, n. 2, p. 9-24, 1983.

BURMEISTER, C. P. N. CREATININA PLASMÁTICA NORMAL et al. Creatinina plasmática normal significa função renal normal? Does normal serum creatinine means normal renal function?. **Revista da AMRIGS**, v. 51, n. 2, p. 114-120, 2007.

BUXTON, David; MCALLISTER, Milton M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

CAIRES, Ana Carla; DA COSTA GILENO, Miriane. Padronização e Aplicação da Curva de Fragilidade Osmótica no Auxílio Diagnóstico de Anemias. **Revista Brasileira Multidisciplinar-Brazilian Multidisciplinary Journal**, v. 15, n. 2, p. 49-58, 2012.

CALZADA CALZADA, P. M. S. E., Quiroz Rocha, G. F. Salmerón Sosa, F et al, Valores hematológicos en vacas de raza Holstein-Friesian seropositivas a *Neospora caninum* de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México. **Veterinaria México**, v. 33, n. 2, 2002.

CAMPELO, S.C.A.J. Perfil Bioquímico Sérico de Éguas Gestantes e Não Gestantes das Raças Brasileiro de Hipismo e Bretão. 2008. Jaboticabal. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal / São Paulo.

CASANUEVA, E.; VITERI, F. E. Iron and oxidative stress in pregnancy. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1700S-1708S, 2003.

CASTILLO, C.; Hernandez, J.; Bravo, A. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 2, p. 286-292, 2005.

CARDOSO, J. M. S. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

CARVALHEIRA, J. BC.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. JA. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CAVDAR, C.; TEMIZ, A.; YENICERIOGLU, Y. et al.; The effects of intravenous iron treatment on oxidant stress and erythrocyte deformability in hemodialysis patients. **Scandinavian Journal of Urology and nephrology**, v.37, n. 1, p. 77-82, 2003.

CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; PEDERSEN, K.; CALERO-BERNAL, R.; KWOK, O. C.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in feral swine (*Sus scrofa*) in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 35-37, 2016.

CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v.21, n.1, p.1-5, 1991.

COLLERY, P. Neosporosis in domestic animals. **Irish Veterinary Journal**, v. 49. p. 152-156, 1996.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 367-337, 2011.

DAMRIYASA, I. M. et al. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 271-286, 2004.

DA SILVA, A. F.; BRANDÃO, F. Z.; FERREIRA, A. M. R.; ANATOMO-HISTOPATOLOGIA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E ANÁLISES CLÍNICAS DE OVINOS INFECTADOS NATURALMENTE POR *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, 2013.

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

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180 (1-2), p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p. 323-367. 2007.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. Veterinary laboratory medicine. 3. ed. Iowa:Iowa State University, 1994. p. 130-151.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1990. p. 421-431.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. EMBRAPA. Estatísticas. 2018. <<https://www.embrapa.br/suínos-e-aves/cias/estatísticas>>.

ERISIR, M.; BENER, F.; KANDEMIR, F. M. Changes in the rate of lipid peroxidation in plasma and selected blood antioxidants before and during pregnancy in ewes. **Acta Veterinaria Brno**, v. 78, n. 2, p. 237-242, 2009.

ESTEVES, V. S.; LASTA, C. S.; LACERDA, L. A. et al. Diferenças na fragilidade osmótica de eritrócitos caninos utilizando tubos de coleta contendo fluoreto de sódio/EDTA (NAF/EDTANA2) e somente EDTA (EDTA K2). **Revista da FZVA**, v. 14, n. 2, 2007.  
EZE, J. I. Onunkwo, J. I., Shoyinka, S. V. O. et al., Haematological profiles of pigs raised under intensive management system in South-Eastern Nigeria. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 31, n. 2, 2010.



FÁVERO, J.A., BELLAVER, C. 2002. Produção de carne de suínos. In: [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_f0q38d0g.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_f0q38d0g.pdf). Acesso em 29/10/2018.

M FERREIRA, M.; M MELO, M.; P MARQUES JUNIOR, A. Concentração de proteína sérica total, albumina, e globulinas em novilhas holandesas soro-reagentes para leucose bovina a vírus durante a gestação e no pós-parto. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n. 3, 2005.

FELICIANO, M. A. R.; AQUINO, A. A.; COUTINHO, L. N. et al. Imunologia na gestação de cadelas: revisão de literatura. **Revta Bras. Reprod. Anim**, v. 36, p. 158-162, 2012.

FERNANDES, W. R., RODRIGUES, J. A., MICHIMA, L. E. D. S., et al. Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 677-680, 2012.

FERNÁNDEZ, E. C. Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental. 2004. **Tese de Doutorado. Universidad Complutense de Madrid**.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRIENDSHIP, R.M. LUMSDEN, J. H., MCMILLAN, I., et al. Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. **Canadian journal of comparative medicine**, v. 48, n. 4, p. 390, 1984.

FLOYD, R. A. Free radicals in molecular biology. **Aging and disease**. New York: Raven, 1984. 416p.

GALVÃO, A. L. B. Estresse oxidativo nos estágios finais da doença renal crônica em pequenos animais. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, n. 3, 2009.

GANONG, W. Fisiología médica, 16. ed. México: **Manual Moderno**, 1998. 587 p.  
 GEBAUER, D. L. P.; BERTHOLO, L. C.; Alterações hematológicas e dos níveis de ferro sérico em gestantes do Centro Municipal de Saúde de Ijuí (RS). **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 17, n. 7/9, p. 64-69, 2013.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 13, p. 133–150, 2013.

GONÇALVES, Rafael Garcia; PALMEIRA, Eduardo Mauch. Suinocultura brasileira. **Observatorio de la economía Latinoamericana**, n. 71, p. 01-11, 2006.

GOES, G. J.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. **Hepatology**, v. 11, n. 4, p. 690-698, 1990.  
GRAVENA, K.; SAMPAIO, R. C. L.; MARTINS, C. B. et al. Parâmetros hematológicos de jumentas gestantes em diferentes períodos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 1514-1516, 2010.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HELMICK, B.; OTTER, A.; MCGARRU, J.; BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. *Research in Veterinary Science*, v. 73, p. 187-189, 2002.

JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea&Febiger, 417 p. 1993.

JANIAK, M. et al. Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition**, v. 94, p. 137-145, 2009.

JENSEN, L. et al. Experimental porcine neosporosis. **Acta Pathologica microbiologica et immunologica scandinavica**, Copenhagen, v. 106, n. 4, p. 475-482, 1998.

JUNIOR, José da Silva Guimarães; ROMANELLI, Paulo Roberto. Neosporosis in domestic animals. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 665-678, 2006.

KADAH, A. Y.; AZAB, M. E.; RANDA, S. et al. Effect of age, pregnancy and lactation on erythrocyte osmotic fragility and membrane phospholipids of holstein friesian cows. **Benha Veterinary Medical Journal**, v. 27, n. 27, p104-115, 2014.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. 436 p.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K.H. Color atlas of biochemistry. 2. ed. New York. 2005, 467p.  
KOMATSU, T., F. ITOH, S. KUSHIBIKI, K. HODATE (2005): Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. J. Anim. Sci. 83, 557-564.

KUNERT, H. C.; DE OLIVEIRA, F. L. C.; NICOLAIEWSKY, S.. **Aspectos hormonais, bioquímicos e hematológicos de pré e pós-parto de suínos**. UFRGS, 1981.

KLEIN, Bradley G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2002.

KNOX, R.; FLOWERS, W. Using real-time ultrasound for pregnancy diagnoses in swine, 2001. Disponível em: .Acesso em: 21/11/ 2018, p.1- 8.

KRAMER, J. W.; W. E. HOFFMAN (1997): **Clinical Enzymology. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. (Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss, Eds.). Academic Press. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 303-325.

LEAL, P. D. S.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. G. Diagnóstico de infecções concomitantes por *Neospora caninum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia* spp. em canino adulto da raça Golden Retriever. Relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 34, n. 1, p. 47-51, 2012.

LINS, Luciana Araujo, Pazinato, F., da Rosa Curcio, B. et al. ESTRESSE OXIDATIVO NA GESTAÇÃO: QUAL A PERCEPÇÃO NA ESPÉCIE EQUINA? - REVISÃO. **Science And Animal Health**, v. 5, n. 2, p. 178-193, 2017.

LOTE, J. M. F. **Alterações hematológicas na gravidez**. 2012. Dissertação de Mestrado.

LUCAS, F. E. S. R. R.; HAGIWARA, M. K. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, 2004.  
LUCIA JR, Thomaz. Políticas e novos conceitos de reposição e descarte de fêmeas suínas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. S1-S8, 2007.

LYKKESFELDT, J., TRUEBA, J.P., POULSEN, H.E., CHRISTEN, S. Vitamin C deficiency in weanling guinea pigs: differential expression. of oxidative stress and DNA repair in liver and brain. **British Journal of Nutrition**, v.98, p.1116–1119, 2007.

MACHADO, L. P; KOHAYAGAWA, A; SAITO, M. E. et al. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na medicina veterinária. **Revista de ciências agroveterinárias**. Lages, v8, n.1, p 84-94, 2009.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. SP.; COZZOLINO, S. MF. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revta Nutr**, v. 12, p. 205-212, 1999.

MALTA, M.B.C., M. A. D. B. L., Parada, C. M. G. L. Utilização das recomendações de nutrientes para estimar prevalência de consumo insuficiente das vitaminas C e E em gestantes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, p. 573-583, 2008.

MAGID, MARGRET S.; PERLIN, MARTIN; GOTTFRIED, EUGENE, L. Increased erythrocyte osmotic fragility in pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 144, n. 8, p. 910-914, 1982.

MANDELKER, L. Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. Veterinary Clinics Of North America: **Small Animal Practice**, v. 38, n. 1, p.1-30, jan. 2008.

MARIELLA, J.; PIRRONE, A.; GENTILINI, F. et al. Hematologic and biochemical profiles in Standardbred mares during peripartum. *Theriogenology*, v. 81, n. 4, p. 526-534, 2014.

MARTINS, P.C. et al. Efeito da temperatura ambiente sobre a viabilidade do sêmen de varrões. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 20, Ed. 167, Art. 1127, 2011.

MELO, DÉBORA PG., DA SILVA, A. C., ORTEGA-MORA, L. M., Prevalência de anticorpos anti-Neospora caninum em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 105-109, 2006.

MELLAGI, A.P.G.; BERNARDI M.L.; BORTOLOZZO, F.P.& Wentz I. 2006. Influência do tamanho da leitegada, parição e presença de mumificados na duração da gestação em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**. 34: 307-311.

MIRANDA, N. C. Bioquímica sanguínea de duas linhagens suínas. **Horizonte científico**, v. 5, n. 1, 2011.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 9, p. 2812-2823, 1993.

MILINKOVIC-TUR, S. et al. Growth and nutrition in the horse. **New York: Books and Company**, 2005. 232 p.

MOSS, D. W.; HANDERSON, A. R. Enzimas. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E.R. (Ed.). **Fundamentos de química clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 19, p.275-325.

MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Internacional Journal for Parasitology**, v.28, n.9, p.1473-78, 1998.

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*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p.1473 – 1478, 1998.

McCULLOCH, C.E.; SEARLE, S.R. Linear and generalized linear mixed models. New York: Wiley, p.358, 2001.

NASCIMENTO J. D. 2010. Fatores determinantes do rendimento de carne magra em suínos: melhoramento genético. In: [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/anais0104\\_donisete.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0104_donisete.pdf). Acesso em 30/10/2018.

OBERLENDER, G.; MURGAS, L. D. S.; MESQUITA, S. P. **Boletim técnico: Inseminação artificial em suínos**. Editora UFLA, n. 79, p. 1-16, 2008.

EZE, J. I. ONUNKWO, J. I.; SHOYINKA, S. V. O. et al. Haematological profiles of pigs raised under intensive management system in South-Eastern Nigeria. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 31, n. 2, 2010.

PALUDO, G. R., McMANUS, C., MELO, R. Q. et al. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exército brasileiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1130 - 1142, 2002.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 273-275, 1995.

PARPART, A.K.; LORENZ, P.B.; PARPART, E.R.; GREGG, J.R.; CHASE, A.M. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. **Journal of Clinical Investigation**. v. 26, n. 4, p. 636-640. 1947.

PENTEADO, C.; VAZ, B.B.D; LACERDA NETO, J.C. et al. Perfil de alguns constituintes bioquímicos do sangue de éguas gestantes da raça árabe. **Veterinária Notícias, Uberlândia**, v. 5, n. 2, p. 83 - 88, 1999.

PIRES, A. T. Y. K. et al. Resposta imunitária in vitro de macrófagos estimulados por *Neospora caninum*. 2012.

RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. D. C. et al. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1235-1243, 2000.

RIBAS, J. T.; BELLÓ, C.; ITO, C. A. S et al. Alterações metabólicas e inflamatórias na gestação. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 36, n. 2, 2015.

ROSSI, R., PASTORELLI, G., CORINO, C. Application of KRL test to assess total antioxidante activity in pigs: Sensitivity to dietary antioxidants. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 372-377, 2013.

SANT'ANA, V. A. C., Birgel, E. H., Mourão, G. B., Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças holandesa, girolando e gir, criados no estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, 2001.

SARAFANA, S.; COELHO, R.; NEVES.; A.et al. Aspectos da imunologia da gravidez. **Acta Med Port**, v. 20, p. 355-58, 2007.

SCHALM, O. W.; JAIN. N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2010.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. **Journal Nutri.**, v. 135, n. 5, p.969-972, maio 2005.

SILVEIRA, PRS. Fatores que interferem na taxa de parição em rebanhos suínos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 31, p. 32-37, 2007.

SIMM, A., and H. J. BRÖMME. 2005. Reactive oxygen species (ROS) and aging: Do we need them, can we measure them, should we block them? *Signal Transduction* 5:115–125.

SILVA, M. O. Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em matrizes suínas de rebanhos comerciais no estado de Santa Catarina. 2017. Mestrado em Ciência Animal – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.

SILVA, S. L.; FAGLIRI, J. J. & CESCO, F. T. R. S et al. Atividade sérica das enzimas AST, ALP e GGT de caprinos das raças anglo-nubiana e saanen criados nos Estados de São Paulo e Paraíba. **Ars Vet**, v. 20, p. 022-027, 2004.

SOARES, H. S.; RAMOS, V. D. N., Osava, C. F. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in wild pigs (*Sus scrofa*) in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Embrapa Pantanal-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.

SOUZA, A. I.; BATISTA FILHO, M.; FERREIRA, L. O. C. Alterações hematológicas e gravidez. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 1, p. 29-36, 2002.

SUHAIL.; PATIL, S.; KHAN, S. et al. Antioxidant vitamins and lipoperoxidation in non-pregnant, pregnant, and gestational diabetic women: erythrocytes osmotic fragility profiles. **Journal of clinical medicine research**, v. 2, n. 6, p. 266, 2010.

TAVARES, D. C. et al. *Neospora caninum*: Aspectos clínicos e epidemiológicos. Revisão de literatura. **Revista CFMV – Brasília/DF**. 2013.

TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE. et al. The role of CD4+ or CD8+ T cells in the protective immuneresponse of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 183-191, 2000.

TONIN, A. A. da S. A. S.; THOMÉ, G. R., et al. Oxidative stress in brain tissue of gerbils experimentally infected with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 1, p. 154-156, 2014.

THRALL, M. A. Morfologia eritrocitária. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W., CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap. 5. p. 52-63.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition, London**, v.16, p.716-718, 2000.

THRALL, M.A. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*, 2nd Edition. São Paulo: Roca, 2012. 592p.

TRIANA, E. L. C.; JIMENEZ, C. R.; TORRES, C. A. A. Eficiência reprodutiva em bovinos de leite. **Universidade Federal de Viçosa. 83a Semana do Fazendeiro**, p. 20, 2012

VANNUCCHI, C. I. LÚCIO.; C. F., REGAZZI, F. M. Perfil de proteínas plasmáticas em cadelas gestantes e não gestantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 781-786, 2016.

VASCONCELOS, S.M.L., GOULART, M. O. F., Moura, J. B. D. F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 2007.

VERHEYEN, A. J.; MAES, D. G.; MATEUSEN, B. et al. Serum biochemical reference values for gestating and lactating sows. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 92-98, 2007.

WALLACH, J. M.D. Interpretação de Exames Laboratoriais. 7. ed. Rio de Janeiro: **Medsa e Ed. Guanabara Koogan S.A**, 2003.

WALADJO, A. R. et al. Neospora caninum antibodies and its consequences for reproductive characteristics in wandering sows from Senegal West África. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, Dubai, v. 5, n. 5, p. 263-266, 2009.

YAKHCHALI, M.; BAHRAMI, M.; ASRI-REZAEI, S. et al. The enzymes and electrolytes profiles in sera of Iranian stray dogs naturally infected with Neospora caninum. **Annals of parasitology**, v. 63, n. 1, p. 63-68, 2017.

ZARDO, V.F. Variação de componentes sanguíneos em função do estágio fisiológico da produção de leite e época do ano em vacas Europeu X Zebu. Belo Horizonte, 1989. 80p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** - Escola de Veterinária UFMG.

ZHAO, Y., FLOWERS, W. L., SARAIVA, A., et al. Effect of social ranks and gestation housing systems on oxidative stress status, reproductive performance, and immune status of sows. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 12, p. 5848-5858, 2013.

ZHOU, Q., MROWIETZ, U., ROSTAMI-YAZDI, M. (2009). Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis, *Free Radical Biology & Medicine* 47, pp. 891–905.

ŽVORC, Z. Sušić, V., & Pompe Gotal, J.I. Haematological and biochemical parameters during pregnancy and lactation in sows. **Veterinarski arhiv**, v. 76, n. 3, p. 245-253, 2006.