

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**“OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM BOVINOS DO
MUNICÍPIO DE UNAÍ/MG”**

Willian Cristof Correia Queiroz

Unaí/MG
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**“OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM BOVINOS DO
MUNICÍPIO DE UNAÍ/MG”**

Willian Cristof Correia Queiroz

Orientadora:

Profa. Dra. Thaís Rabelo dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Agrárias, como parte dos
requisitos exigidos para a conclusão do
Bacharelado em Ciências Agrárias.

Unaí/MG
2018

**“OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-Neospora caninum EM BOVINOS DO
MUNICÍPIO DE UNAÍ/MG”**

Willian Cristof Correia Queiroz

Orientadora:

Profa. Dra. Thaís Rabelo dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Agrárias, como parte dos
requisitos exigidos para a conclusão do
Bacharelado em Ciências Agrárias.

APROVADO em 23/02/2018

Profa. Dra. Thaís Rabelo dos Santos

Profa. Dra. Débora Ribeiro Orlando

Prof. Dr. Eric Francelino Andrade

SUMÁRIO

1. Introdução.....	6
1.1. Histórico	6
1.2. Ciclo de vida e morfologia dos parasitos	7
1.3. Prevalência.....	9
1.4. Fontes de Infecção	12
1.5. Sinais Clínicos	14
1.6. Métodos Diagnósticos	15
1.7. Tratamento.....	17
1.8. Profilaxia	18
2. Objetivos.....	19
3. Metodologia.....	19
3.1. Local da pesquisa.....	19
3.2. Bovinos experimentais	19
3.3. Amostras sanguíneas	20
3.4. Questionário	20
3.5. Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti- <i>N. caninum</i>	21
3.5.1. Obtenção de antígenos de <i>N. caninum</i> para confecção das lâminas	21
3.5.2. Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI-IgG) anti- <i>N. caninum</i>	21
4. Resultados.....	22
5. Discussão	22
6. Conclusão	23
7. Referências	23
AUTORIZAÇÃO	29

“OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM BOVINOS DO MUNICÍPIO DE UNAÍ/MG”

Resumo:

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório que causa infecções associadas a aborto e mortalidade neonatal em várias espécies animais, mas os bovinos sendo considerados os hospedeiros intermediários de maior importância, principalmente pelas perdas em reposição dos animais considerados positivos, abortos provocados pela neosporose e gastos com diagnósticos. Doença que está presente nos cinco continentes, o Brasil apresenta variabilidade de soroprevalência entre 7,67% e 91,2%, envolvendo vários estados, mas com escassez de informações sobre Unaí/MG. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar soroprevalência de *N. caninum* em bovinos do município de Unaí, microrregião de Unaí/Minas Gerais. Foram utilizados 439 bovinos de 19 propriedades rurais, no período de agosto de 2016 a junho de 2017. A coleta de sangue total para realização das provas sorológicas foi realizada por venocentese da veia coccídea. Em seguida, o sangue total foi centrifugado, para obtenção do soro, e então armazenados a -20°C, até a realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Este município possui significativa representação econômica em termos de produção com mais de 72.543.000 litros anuais e, apresentou 57,63% (n=253) de prevalência do patógeno no rebanho. A soroprevalência de *Neospora caninum* no estado de Minas Gerais apresentou-se na média de amplitude encontrada no Brasil. Apesar disso, o presente estudo indica a difusão e estabelecimento de métodos profiláticos a serem implantados no sistema de produção familiar, a fim de minimizar os prejuízos provocados pela enfermidade visto não haver tratamento.

1. Introdução

1.1. Histórico

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo *Ampicomplexa*, família *Sarcocystidae* e gênero *Neospora* causa infecções associadas a aborto e mortalidade neonatal em várias espécies animais (DUBEY E LINDSAY, 1996, citado por BRINKER, 2012).

Descrita por BJERKAS et al. (1984) pela primeira vez na Noruega em seis filhotes de cães da raça Boxer, como agente de doença neuromuscular que apresentavam paralisia associada à presença de cistos no cérebro e no tecido muscular (BRINKER, 2012; LLANO, 2013).

DUBEY et al. (1988) nos Estados Unidos, identificaram em um cão com meningoencefalomielite e miosite, a presença de um novo parasita com características morfológicas e antigênicas diferentes da *Toxoplasma gondii*, no qual era, até então confundido, sendo nomeado como *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988a). Neste mesmo ano, foi realizado o primeiro isolamento do parasita em camundongos (DUBEY et al., 1988b).

Em 1998, MCALLISTER et al., dá um passo importante no conhecimento da biologia desse agente, concluindo o ciclo do parasita, relatando os cães (*Canis lupus familiaris*) como hospedeiros definitivos. Posteriormente outros animais foram confirmados como hospedeiro definitivos, eliminando oocistos em suas fezes, sendo eles os coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo (*Canis lupos dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lúpus*) (DUBEY et al., 2011).

O *N. caninum*, que se acredita ser cosmopolita, é o agente mais frequente identificado em fetos abortados em vários países (PIAGENTINI, 2003). No Brasil, GONDIM et al. (1999) descreveram o primeiro caso de neosporose na região de Botucatu–SP, que ocorreu em um feto bovino. Entretanto esta enfermidade já havia sido descrita em 1989 nos Estados Unidos, onde pela primeira vez foi relacionada à causa de abortamento em bovinos, cinco anos após ter sido diferenciada da toxoplasmose em cães. Tem ampla

distribuição nos países de primeiro mundo, onde a doença é considerada a principal causa de abortamento em bovinos, afetando tanto o rebanho de corte como de leite (PIAGENTINI, 2003)

Ainda se desconhece o potencial zoonótico desta parasitose (BRINKER, 2012). O primeiro relato de *Neospora caninum* em seres humanos foi relatado em um estudo epidemiológico por NAM et al. (1998), onde se observou um índice de 6,7% de pessoas soropositivas para *Neospora caninum* numa população de 172 pessoas soropositivas para *Toxoplasma gondii*.

1.2. Ciclo de vida e morfologia dos parasitos

N. caninum é um protozoário que apresenta ciclo de vida heteróximo, com reprodução sexuada ocorrendo no hospedeiro definitivo, e a reprodução assexuada nos hospedeiros intermediários (LLANO, 2013). O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), o coiote (*Canis latrans*), o lobo cinzento (*Canis lupus*) e o dingo (*Canis lupus dingo*) são reconhecidos como hospedeiros definitivos (GOODSWEN et al., 2013). Quanto aos hospedeiros intermediários, além do bovino e do próprio cão, há confirmação de infecção natural também em antílope, bisão, búfalo, cabra, camelo, cavalo, cervo, coiote, felinos selvagens, guaxinim, javali, lagomorfos, lobo, mamíferos marinhos, ovelha, raposa, rinoceronte, roedores e veado (ÁLVARES-GARCÍA, 2003; DUBEY et al., 2003b; DUBEY et al., 2007, citado por LLANO, 2013). No entanto, há um crescente reconhecimento de que a faixa de hospedeiro intermediário é mais larga e a *Neospora caninum* pode potencialmente infectar quaisquer vertebrados de sangue quente dada à oportunidade (GOODSWEEN et al., 2013).

HERNANDEZ et al. (2001) e BARR et al. (1997) afirmam que os bovinos são considerados os hospedeiros intermediários de maior importância, principalmente pelas perdas em reposição dos animais considerados positivos, abortos provocados pela neosporose e gastos com diagnósticos.

O *N. caninum* possui em seu ciclo evolutivo três estágios conhecidos (figura. 1): esporozoítos, contidos no oocisto, taquizoítos (estágio de multiplicação intracelular rápida)

e bradizoítos (estágio de multiplicação intracelular lenta) contidos no cisto tecidual (DUBEY & LAPPIN, 1988; citado por PIAGENTINI, 2003).

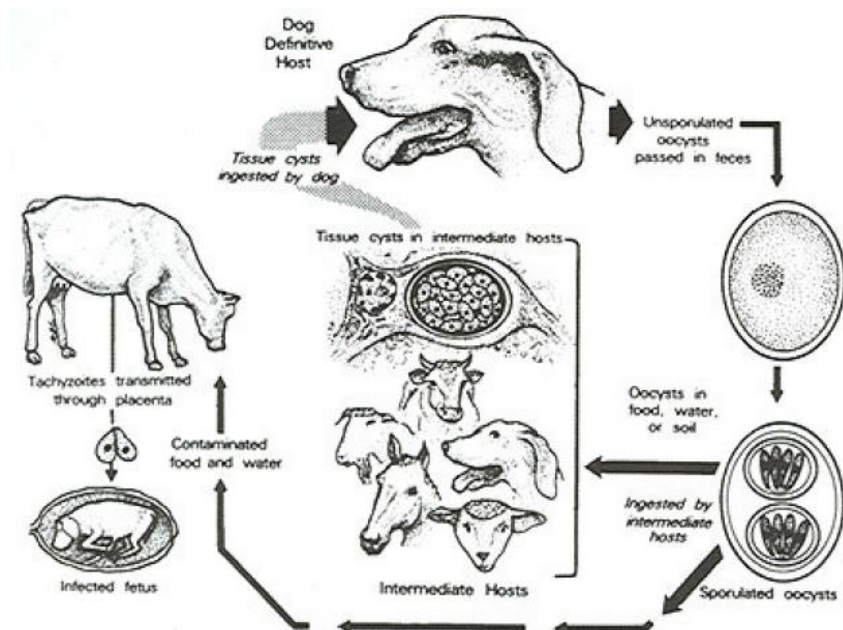


Figura 1. Ciclo de vida do *Neospora caninum* evidenciando as diferentes formas de transmissão. Fonte: DUBEY (1999)

Os taquizoítos, de multiplicação celular rápida, são ovóides, semilunares ou globulares dependendo do estágio da divisão, medem entre 1-5 x 3-7 μm , e estão localizados dentro de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula hospedeira, cada um podendo conter entre 6 a 16 roptrias (LLANO, 2013). Apresentam várias estruturas no seu interior localizadas na porção apical, que desempenham funções de secreção de enzimas, fixação com adesão aos receptores de superfície e sustentação (BRINKER, 2012). Os taquizoítos podem ser encontrados em várias partes do organismo hospedeiro como as células nervosas, macrófagos, células endoteliais vasculares, miócitos, células epiteliais tubulares renais, hepatócitos, coração, pulmão, rins e placenta (DUBEY, 1999b; citado por BRINKER, 2012).

Os bradizoítos, de multiplicação celular lenta, estão localizados dentro dos cistos teciduais, são alongados (DUBEY & LINDSAY, 1996) e podem medir cerca de 6,5 x 1,5

µm (DUBEY et al., 2004). Normalmente contêm as organelas encontradas noutros coccídios como grânulos densos grandes e pequenos, micronemas e roptrias que podem ser entre 6 e 12. Podem persistir no transcurso de toda a vida do hospedeiro sem causar manifestações clínicas (DUBEY & LINDSAY, 1996).

Os cistos de tecido são geralmente redondos ou ovais, podendo chegar a 107 µm de comprimento, sua parede é de até 4 µm de espessura e são encontrados primariamente no sistema nervoso central (SNC) (DUBEY, 2003)

Os oocistos medem aproximadamente 11,3 x 11,7 µm, sua parede é incolor e mede entre 0,6 a 0,8 µm de espessura (LLANO, 2013). Cada oocisto contém dois esporocistos, com dimensões médias correspondentes a 8,4 x 6,1 µm, cada um destes com quatro esporozoítos (BRINKER, 2012), sendo estes alongados, apresentando uma dimensão de 6,5 a 2,0 µm (DUBEY et al., 2002, citado por BRINKER, 2012).

1.3. Prevalência

A neosporose bovina é uma doença que está presente nos cinco continentes, sendo relatada como a principal falha reprodutiva nos rebanhos bovinos (DUBEY, 1999; DUBEY et al., 2007). Na Califórnia, a neosporose foi apontada como a maior causa de abortamento em bovinos de leite (ANDERSON et al., 1991) com uma prevalência de 42,5% de 266 animais de um rebanho leiteiro (ANDERSON et al., 1995).

As infecções bovinas por *Neospora caninum* tem sido relatada nos EUA (ANDERSON et al., 1991), Nova Zelândia (THORNTON et al., 1991), Holanda (WOUDA, 1998), Argentina (CAMPERO et al., 1998), Bélgica (DE KRUIF et al., 1997), Canadá (PARE et al., 1998), Dinamarca (ANGERHOLM et al., 1997), Alemanha (SCHARES et al., 1997), Hungria (HORNOK et al., 1998), Itália (MAGNINO et al., 1998), Japão (YAMANE et al., 1997), México (MOLARES et al., 1998), Espanha (FONDEVILA et al., 1998); Suécia (STENLUND et al., 1997) e Reino Unido (BUXTON et al., 1997a) (DUBEY, 1999).

Na Inglaterra e País de Gales, foi estimado que 12,5% dos abortamentos bovinos são causados pela neosporose (DAVISON; OTTER; TRESS, 1999b, citado por UENO, 2005).

No Brasil foram realizados estudos em vários estados, apresentando variabilidade de dados de soroprevalência entre 7,67% (SOUSA et al., 2012) a 91,2% (GUEDES et al., 2008). Estes números assim como de outros países de América do Sul como Argentina, Colômbia, Equador, Peru, Uruguai e Venezuela são apresentados na TABELA 1 (LLANO, 2013).

TABELA 1. Soroprevalência para neosporose bovina em países do América do Sul , 2004-2013. (FONTE: LLANO, 2013).

País	Estado	Número de animais	Positivos	%	Fonte
Argentina	-	4190	595	14,2%	MOORE et al., 2009
	-	1042	268	25,7%	MOORE et al., 2008
Brasil	<i>Alagoas</i>	1042	77	7,67	SOUSA et al., 2012
	<i>Goiás</i>	358	170	47,49	GUIMARÃES et al., 2011
	<i>Goiás</i>	930	283	30,43	MELO et al., 2006
	<i>Maranhão</i>	812	412	50,74	TEIXEIRA et al., 2010
	<i>Mato Grosso do Sul</i>	2448	449	14,9	OSHIRO et al., 2007
	<i>Minas Gerais</i>	559	510	91,2	GUEDES et al., 2008

	<i>Minas Gerais</i>	534	247	46,3	SANTOS et al., 2009
	<i>Pará</i>	160	30	19	MINERVIN O et al., 2008
	<i>Paraná</i>	1778	431	24,2	CAMILO et al., 2010
	<i>Paraná</i>	309	63	20,4	MARTINS et al., 2012
	<i>Pernambuco</i>	469	163	31,7	SILVA et al., 2008
	<i>Pernambuco</i>	306	39	12,6	AMARAL et al., 2012
	<i>Rio de Janeiro</i>	563	131	23,2	MUNHOZ et al., 2006
		373	86	23,1	MOURA et al., 2012
	<i>Santa Catarina</i>	615	197	32	PIAGENTINI et al., 2012
	<i>São Paulo</i>	192	48	25	MARTINS et al., 2011
Colômbia	<i>Tocantins</i>	357	193	54,1	ZAMBRAN O e
	<i>Bogotá-Nariño-Caribe</i>	196	19	10,2	COTRINO, 2001
	<i>Córdoba</i>	347	120	34,6	OVIETO et al., 2077
	<i>Antioquia</i>	108	29	27	LÓPEZ et al., 2007
					OVIETO et

	<i>Cesar</i>	300	267	89	al.,2008
	<i>Cesar</i>	238	183	76,9	PENA et al., 2012
Equador	<i>Pasto</i>	395	166	42	CEDENO e BENAVIDES , 2003
Perú	<i>Centro-Norte</i>	347	43	12,4	LOZADA, 2004
	<i>Junín</i>	182	85	46,7	PURAY et al., 2006
Uruguai	<i>Junín</i>	734	211	28,8	GRANADOS , 2012
Venezuela	<i>Tacuarembó-</i>	162		44	FURTADO et al., 2011
	<i>Durazno</i>				
	<i>Torres</i>	550	94	17,1	ORBANDO et al., 2010
	<i>Yaracuy</i>				ESCALONA et al., 2010

Fonte: LLANO, 2013.

1.4. Fontes de Infecção

MCALLISTER (1998) e DIJKSTRA (2001) relatam que as vias de infecção do *Neospora caninum* são a vertical (ou congênita) e a horizontal, com a ingestão de oócitos esporulados ou de cistos teciduais por carnívoros (BRINKER, 2012).

Os cães, hospedeiros definitivos (MCALISTER et al., 1998), se contaminam ao ingerir líquido fetal (importante fonte infectante), restos placentários e feto de bovino abortados, bem como a carne crua contendo o protozoário. Para que o cão se torne o hospedeiro definitivo é necessário que este ingira o protozoário na forma de cisto ou no estágio de taquizoíto (PIAGENTINI, 2003); os oocistos do protozoário são eliminados nas

fezes, onde estes podem esporular no ambiente, de 24 a 72 horas (LINDSAY et al., 1999; PIAGENTINI, 2003).

Outras espécies de animais como equinos, bovinos, caprinos e veados podem atuar como hospedeiro intermediário, pela ingestão de oocistos do protozoário através de água ou alimento contaminado com fezes de cães (DUBEY, 1999, citado por PIAGENTINI, 2003).

DUBEY et al., (2006) afirma que a *Neospora caninum* é transmitida de forma muito eficiente em bovinos, tanto pelas vias horizontais quanto pelas vias verticais (transmissão transplacentária exógena e endógena) (Figura. 2). A transmissão transplacentária exógena ocorre após uma infecção primária, enquanto a transmissão transplacentária endógena ocorre após a reativação de uma infecção persistente já estabelecida. A via vertical é responsável pela propagação de infecção a partir de uma barragem persistentemente infectados para seus filhos durante a gravidez (DUBEY et al., 2006), mantendo a infecção de forma crônica por várias gerações (ANDERSON et al., 2000).

Apesar de já ser demonstrada a presença de DNA do parasita no sêmen de machos (DA SILVA et al., 2004; FERRE et al., 2005), a via venérea parece ser pouco provável (BRINKER, 2012). Devido à baixa frequência de sêmen infectado e da carga parasitaria, observando uma menor chance de transmissão da neosporose bovina (DA SILVA et al., 2004).

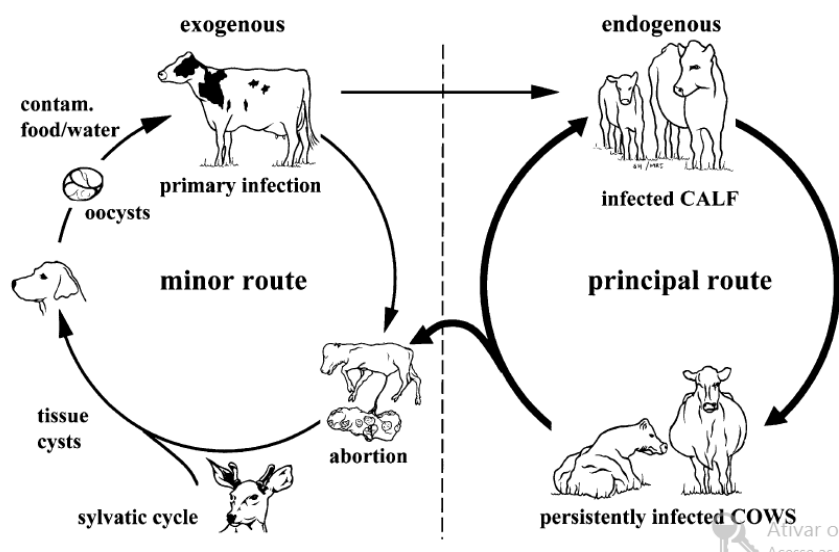


FIGURA 2: A transmissão horizontal (ou pós-natal) vai ser dada pela ingestão de tecidos contaminados com cistos no caso de cão ou por água ou pastagem contaminada por oocistos no caso de bovinos. Oocistos (liberados pelo hospedeiro definitivo), quando ingerido por uma vaca prenhe leva a infecção ao feto (transmissão transplacentária exógena). Pode ocorrer o aborto ou as bezerras podem nascer vivas onde permanece infectada na idade adulta, quando elas por sua vez, pode passar a infecção ao seu feto (transmissão transplacentária endógena). Este ultima é considerado a principal via pela qual o parasita é propagado em um rebanho. Fonte: DUBEY et al., 2006.

1.5. Sinais Clínicos

O aborto é a principal manifestação clínica da neosporose bovina, tanto em gado leiteiro quanto de corte (DUBEY et al., 2006). Vacas de qualquer idade podem abortar a partir de três meses de gestação, sendo a maioria dos abortos ocorrendo entre 5-7 meses de gestação (DUBEY et al., 2007, citado por ALMERÍA & GATIUS. 2013). Os fetos podem morrer no útero, ser reabsorvido, mumificado, autolisado, notimorto, nascidos vivos com sinais clínicos, ou nascido clinicamente normal, mas persistentemente infectados (DUBEY & SCHARES, 2006).

Os sinais clínicos, além do aborto, que só foram relatados em bezerros com menos de 4 meses de idade, incluem sinais neurológicos, incapacidade de se levantar e peso ao nascer abaixo da média. Em exame neurológico pode revelar ataxia, diminuição dos reflexos patelar e perda de propriocepção consciente. Exoftalmia ou uma aparência assimétrica para os olhos pode ser conseguida e, ocasionalmente, defeitos congênitos incluindo hidrocefalia e um estreitamento da medula espinhal pode ocorrer (BARR et al., 1991b; BARR et al., 1993; DUBEY et al., 1998a; DUBEY et al., 1990a; DUBEY & DE LAHUNTA, 1993; DE MEERSCHMAN et al., 2005, citado por DUBEY & SCHARES, 2006). No entanto, até 95% dos bezerros nascidos congenitamente infectados a partir de barragens soropositivos permanece clinicamente normal (DUBEY, 2003).

Cães de qualquer idade podem desenvolver a doença clínica, que pode ser generalizada, com praticamente todos os órgãos envolvidos (incluindo a pele) ou localizada (BARBER & ÁRVORES, 1996, citado por BUXTON et al., 2002). Sendo fatal em qualquer faixa etária (BRINKER, 2012). Os casos mais graves da doença localizada ocorrem em filhotes jovens, congenitamente infectados (BUXTON et al., 2002), onde os

cães nascem sem sintomas e começam a desenvolver os sinais clínicos três ou mais semanas após o nascimento (DUBEY et al., 2007). Os animais mostram uma paresia inicial dos membros posteriores, que evolui para paralisia. Os sinais neurológicos são dependentes dos locais parasitados no SNC e os sinais nos membros posteriores, que são mais severamente afetados do que os membros anteriores são muitas vezes uma hiperextensão rígida. Cães com paralisia dos membros posteriores podem sobreviver por meses (BUXTON et al., 2002).

Outras disfunções que ocorrem incluem dificuldades em engolir, paralisia de mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular, insuficiência cardíaca (BUXTON et al., 2002), miocardite, pneumonia, hepatite, necrose muscular, encefalomielite, meningomielite não supurativa e multifocal (BRINKER, 2012). Há relatos esporádicos de infecção ocular, úlceras na mucosa oral e dermatite ulcerativa (LORENZO et al., 2002, citado por BRINKER, 2012).

A neosporose pode acometer também outras espécies, causando além de abortos, infecções neonatais. Dentre essas espécies podemos citar ovinos, equinos e caprinos (ANDERSON et al., 1991; DUBEY & PORTERFIELD, 1990; LOPES, 1999, citado por PIAGENTINI, 2003).

1.6. Métodos Diagnósticos

As técnicas diagnósticas precisas para detecção de animais infectados com *Neospora caninum* são a chave para o entendimento dos aspectos epidemiológicos da neosporose (BRINKER, 2012). O diagnóstico pode ser realizado por detecção parasitológica pós-morte, ocorrendo a demonstração do parasito nos tecidos (SILVA, 2004), por técnica histopatológica, imuno-histoquímica ou por detecção de anticorpos específicos (HEMPHILL et al., 2000).

As técnicas histológicas são muito utilizadas no diagnóstico do aborto por *Neospora caninum* (SILVA, 2004), estando baseado em lesões produzidas nos tecidos parasitados (BRINKER, 2012). As lesões mais características são focos de infiltrado mononucleares e células da glia ao redor de um foco central de necrose (DUBEY & LINDSAY, 1996). O

feto deve ser enviado ao laboratório, juntamente com a placenta, e se possível com o soro sanguíneo da mãe. Os órgãos de eleição para o diagnóstico são o cérebro, coração, fígado (SILVA, 2004) e músculo esquelético (DUBEY & LINDSAY, 1996). As lesões também estão presentes na placenta, porém o parasito é difícil de ser encontrado nesse tecido (BARR et al., 1991), pois as lesões macroscópicas são poucos frequentes (DUBEY & LINDSAY, 1996; ANDERSON et al., 2000) e o número de parasito é escasso (CORBELLINI et al., 2002).

As técnicas de imunohistoquímica (IHQ) permitem evidenciar o agente nos tecidos, utilizando soro policlonal ou anticorpo monoclonal anti-*Neospora caninum* (LINDSAY & DUBEY, 1989, citado por BRINKER, 2012).

Várias técnicas baseadas em PCR (Reação de Cadeia da Polimerase) foram desenvolvidas tendo como sequência alvo a região ITS1 do DNA ribossômico e a sequência Nc5 do DNA genômico de *Neospora caninum*. São de grande utilidade no diagnóstico da doença, pois permitem amplificar pequenas quantidades de DNA até em tecidos que já se encontram em autólise (COLLANTES-FERNÁNDES et al., 2002), possuindo alta sensibilidade e especificidade (SILVA, 2004). Esta técnica tem sido amplamente utilizada em pesquisas e diagnósticos de neosporose (SILVA, 2004), porém é pouco utilizado na rotina devido seu alto custo (BRINKER, 2012)

De acordo com SILVA (2004) pode-se fazer o diagnóstico de neospora pelo isolamento do agente, realizado através do cultivo celular (*in vitro*) e/ou inoculação em animais sensíveis, imunossuprimidos ou não. O cultivo *in vitro* é feito em rim bovino, fibroblasto humano, em cérebro de feto de rato, células Vero (células de rim de macaco verde africano) e em várias outras linhagens estabelecidas (DUBEY & LINDSAY, 1996).

Os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico da neosporose subclínica são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), *immunoblotting* (IB) e teste de aglutinação (AT) (SILVA, 2004), que indicam a exposição dos animais ao neospora, não significando que estejam acometidos pela doença (DUBEY & LINDSAY, 1996).

O *Imunoblotting* (IB) tem sido mais utilizado como auxiliar, junto com outros testes, do que como um teste na rotina de diagnóstico, sendo importante na identificação de antígenos imunodominantes (IDAs) (SILVA, 2004).

O teste de aglutinação direta para a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* (NAT) foi aprimorado por ROMAND, THULLIEZ e DUBEY (1998) (BRINKER, 2012). A técnica baseia-se no princípio da aglutinação de taquizoítos, na presença de anticorpos específicos e tem como vantagem não necessitar de um anticorpo secundário, espécie-específica, tornando a técnica mais simples (SILVA, 2004).

O ELISA é um teste simples e rápido de se realizar e a possibilidade de automatização dos resultados e baixo custo econômico são vantagens, quando um grande número de amostra é examinado (SILVA, 2004). No entanto, outros testes são necessários para determinar a especificidade do ELISA (SARTOR et al., 2003).

O teste RIFI foi o primeiro teste utilizado para detecção de anticorpos para *Neospora caninum* (BRINKER, 2012) e tem sido reconhecido como teste de referência para neosporose (BJORKMAN & UGGLA, 1999; ATKINSON et al., 2000, citado por SILVA, 2004). De acordo com BRINKER (2012) este teste consiste na fixação de taquizoítos de *Neospora caninum* em lâminas de microscopia, que são incubadas com soros diluídos e em seguida com anticorpos ligados a fluoresceína. A reação é avaliada pela observação da reação em microscopia de fluorescência (BJORKMAN & UGGLA, 1999, citado por BRINKER, 2012). A RIFI é considerada uma técnica mais específica, porém existem divergências entre os autores sobre o ponto de corte, sendo mais aceito os títulos de 1:200 (DUBEY e LINDSAY, 1996).

1.7. Tratamento

O tratamento em bovino é ineficaz (DUBEY & SCHARES, 2011; WESTON et al., 2012; WEBER et al., 2013, citado por ALMERÍA; LÓPES-GATIUS, 2013; BRINKER, 2012), mas em cães com sinais neurológicos, apesar de o prognóstico ser reservado a desfavorável, o tratamento é longo (BRINKER, 2012).

Os mais utilizados como tratamento em cães são clindamicina (11-22mg/kg, BID-TID), sulfonamidas (15mg/kg, BID) e pirimetamina (1mg/kg) (BARBER, 1998, citado por BRINKER, 2012). O grau de sucesso desse tratamento é usualmente baixo, embora haja relato de resolução completa dos sintomas de neosporose em cão adulto com a administração combinada de 1mg/kg/dia de pirimetamina e 20mg/kg/dia de sulfadoxina durante um mês (THATE et al., 1998, citado por BRINKER, 2012).

1.8. Profilaxia

Em virtude da carência de informações relacionadas ao tratamento de gado junto à falta de quimioterapia ou de vacina eficaz para a neosporose bovina (VANLEEUEWE et al., 2011; DUBEY e SCHARES, 2011; WESTON et al., 2012; WEBER et al., 2013; citado por ALMERÍA e LÓPES-GATIUS, 2013), a adoção de medidas preventivas e efetivas de controle são essenciais para a diminuição dos riscos em relação ao protozoário (BRINKER, 2012).

O controle da neosporose deve ser feito por meio de ação que visem interromper as vias de transmissão do agente. A identificação dos animais positivos para posterior eliminação e prevenção do ingresso de novos animais infectados ao rebanho pode diminuir a transmissão vertical (ÁLVARES-GARCIA, 2003, citado por LLANO, 2013). Em relação aos cães devem-se adotar rigorosas políticas a fim de se evitar o contato entre cães e rebanhos (ALMERÍA & LOPEZ-GATIUS, 2013), para que não ocorra a contaminação das pastagens e dos bovinos pelos oocitos, reduzindo-se a possibilidade de contato dos bovinos com as fezes de cães infectados. Assim como também é muito importante realizar o manejo adequado de tecidos infectados por *N. caninum* para que os cães não entrem em contato com estes (BRINKER, 2012).

Outra alternativa para um maior controle profilático, consiste na transferência de embriões, ANDERSON et al. (2000) relata que a infecção por *Neospora caninum* não era demonstrável em fetos ou bezerros nascidos de vacas soronegativas de embriões de doadoras soropositivos transplantado, enquanto bezerros resultantes da transferência de embriões de doadoras soronegativas para destinatários soropositivos, foram infectados com *N. caninum*.

2. Objetivos

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar soroprevalência de *N. caninum* em bovinos do município de Unaí, microrregião de Unaí/Minas Gerais.

3. Metodologia

3.1. Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no município de Unaí/MG, situado na mesorregião do Noroeste de Minas Gerais, representando 1,443 % do estado, 0,9155 % da Região Sudeste do Brasil e 0,0996 % de todo o território brasileiro. Sua população estimada era de 82.298 habitantes segundo IBGE/2014.

O Município de Unaí/MG localiza-se a aproximadamente 590 km da capital Belo Horizonte e situa-se a 16°21'50"S de latitude; 46°54'15"O de longitude, 640 metros de altitude em relação ao nível do mar, além de apresentar uma área de 8.447,107 km² e ser de clima Tropical.

3.2. Bovinos experimentais

A pesquisa foi realizada em 19 propriedades do município de Unaí/MG, todas distribuídas ao acaso assim como os animais. Foram utilizados 439 bovinos de leite, determinados pelo programa estatístico Epi Info7 fornecido pelo CDC (com intervalo de confiança de 95%, precisão de 5% e frequência esperada de 50%). As informações relativas à identificação, procedência e aspectos reprodutivos dos animais foram anotadas em fichas individuais.

3.3. Amostras sanguíneas

A colheita de sangue total para realização das provas sorológicas foi realizada por venocentese da jugular ou cocídea, com agulhas 40x12 acopladas a seringas estéreis de 10 mL, após a antissepsia local. Em seguida, o sangue total foi centrifugado a 3000 rpm (1620g), durante 10 minutos, para aquisição do soro, e então congelados a -20°C.

3.4. Questionário

Foi aplicado um questionário ao proprietário ou responsável durante a coleta de sangue nas fazendas selecionadas, no qual os dados abordados da propriedade são: objetivo de exploração (carne, leite mista), tipo de exploração (intensiva, semi-intensiva e extensiva), consórcio com outros animais (sim ou não), suplementação mineral (sal proteinado, sal mineral ou sal comum), fonte de água (açude, cisterna, poço profundo ou poço artesiano), tipo de terreno (plano ou alagado), tipo de bebedouro (cimento, pneu, plástico ou misto), tipo de comedouro (cimento, pneu, plástico ou misto), acompanhamento técnico veterinário (sim ou não), tamanho da propriedade (até 10 hectares, de 11 a 100 hectares ou mais de 100 hectares), atividade principal (pecuária ou mista), mal formação fetal nos últimos 12 meses (sim ou não), aborto nos últimos 12 meses (sim ou não), problemas neurológicos (presente ou ausente), presença de roedores no celeiro (presente ou ausente), presença de cães na propriedade (presente ou ausente), instalações utilizadas para estocar ração (sim ou não), os cães têm acesso a estas instalações utilizadas para estocar ração (sim ou não), os cães têm acesso a água oferecida aos animais (sim ou não), locais de acesso de cães (dispensa, pastagem ou celeiro).

3.5. Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*.

3.5.1. Obtenção de antígenos de *N. caninum* para confecção das lâminas

Para a pesquisa de anticorpos contra *N. caninum* foram utilizadas lâminas contendo taquizoítos íntegros de *Neospora caninum* da cepa Nc-1, produzido em cultivo celular de células Vero, pertencente ao Laboratório de Parasitologia Veterinária e Doenças Parasitárias, do Departamento de Medicina Veterinária, da Fundação Universidade Federal de Rondônia.

3.5.2. Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI-IgG) anti-*N. caninum*

Para a execução da pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, as amostras foram submetidas à Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) preconizado por CONRAD et al. (1993).

Os soros dos bovinos foram diluídos na base dois, iniciando-se com 1:200, em solução salina tamponada com fosfatos 0,1 M, pH 7,2 (PBS). Em cada cavidade da lâmina, contendo o substrato antigênico, foi colocada a amostra sob estudo, sendo incubada por 30 minutos à temperatura de 37 °C em câmara úmida. Após incubação cada lâmina passou por três lavagens consecutivas de 5 minutos cada, em PBS (pH 7,2) e colocadas para secar por dez minutos na estufa a 37° C. Em seguida, sobre as lâminas foi adicionado 10µL de conjugado (anti-IgG-bovino-SIGMA/F-7887), utilizado a diluição de 1:200 em PBS, contendo azul de Evans a 0,01%. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C. Posteriormente as lâminas foram lavadas novamente por três vezes consecutivas de 5 minutos cada, em PBS (pH 7,2). Após a secagem na estufa a 37° C por dez minutos, foi adicionada glicerina tamponada em carbonato bicarbonato 0,1M, pH 9,5 e as mesmas foram recobertas com lamínulas e examinadas em microscópio de imunofluorescência com objetiva de 40x. As reações com título igual ou maior que 200 foram consideradas positivas (DUBEY & LINDSAY, 1996).

4. Resultados

A análise das amostras de bovinos colhidas no município de Unaí/MG, pertencentes as 19 propriedades, revelou uma prevalência de anticorpos anti-*N. caninum*, da ordem de 57,63% (n=253). Os resultados encontrados na presente pesquisa estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Detecção de anticorpos (IgG) anti-*N. caninum* em soro de bovinos do município de Unaí/MG.

Espécie	RIFI-IgG (<i>N. caninum</i>)		Total
	Reagente (%)	Não reagente (%)	
Bovino	253 (57,63)	186 (42,37)	439

5. Discussão

Sendo a pecuária leiteira um importante setor do agronegócio, principalmente no que tange a renda familiar rural, (o que representa milhares de famílias), fica claro a importância da realização de levantamento sobre uma das principais causas de prejuízo econômico nesta cadeia produtiva.

A neosporose causa infecções associadas a aborto e mortalidade neonatal em várias espécies animais (DUBEY E LINDSAY, 1996), especialmente nos bovinos, hospedeiro intermediário de maior importância (HERNANDEZ et al., 2001; BARR et al., 1997).

Estando presente nos cinco continentes, inclusive no Brasil, os achados sorológicos encontrados no município de Unaí/MG são semelhantes aos encontrados no Estados Unidos nesta categoria de produção (ANDERSON et al., 1991).

Da mesma forma, segue as características brasileiras enquadrando-se na

variabilidade de soroprevalência (GUEDES et al., 2008; SOUSA et al., 2012), especialmente quando comparado com os dados levantados nos estados de Goiás (GUIMARÃES et al., 2011) e Minas Gerais (SANTOS et al., 2009), que utilizaram números semelhantes de animais para seus estudos.

Com prevalência maior que os estados de Alagoas (SOUSA et al., 2012), Mato Grosso do Sul (OSHIRO et al., 2007), Pará (MINERVINO et al., 2008), Paraná (CAMILO et al., 2010), Pernambuco (AMARAL et al., 2012) e Rio de Janeiro (MUNHOZ et al., 2006), e menor que os estados do Maranhão (TEIXEIRA et al., 2010) e Minas Gerais (GUEDES et al., 2008), acredita-se que as características econômicas, geográficas e culturais possam influenciar a maior ou menor prevalência do agente nas diferentes regiões, especialmente pelas diferentes condições climáticas e o Brasil ser um país de ordem continental (GUEDES et al., 2008; SOUSA et al., 2012). Essas características e divergências nos sistemas de produção em relação à outros estados corroboram para a grande amplitude na ocorrência do patógeno e sua distribuição, mas mantém o estado dentro dos parâmetros brasileiros (LLANO, 2013).

6. Conclusão

A soroprevalência de *Neospora caninum* no estado de Minas Gerais apresentou-se na média de amplitude encontrada no Brasil. Apesar disso, o presente estudo indica a difusão e estabelecimento de métodos profiláticos a serem implantados no sistema de produção familiar, a fim de minimizar os prejuízos provocados pela enfermidade visto não haver tratamento.

7. Referências

- ANDERSON, M.L., ANDRIANARIVO, A.G. & CONRAD, P.A. (2000). Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, 60:417-431.
- ALMERÍA, S.; LÓPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 2, p. 303-309, 2013.

- ATKINSON, R. A., R. W. COOK, L. A. REDDACLIFF, J. ROTHWELL, K. W. BROADY, P. A. W. HARPER, and J. T. ELLIS. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. **Aust. Vet. J.** 78:262-266.
- BARBER JS, TRESS AJ. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int J*
- BJERKAS I., MOHN S.F. & PRETHUS J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde** 70:271-274.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.
- BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology, Oxford**, v. 18, p. 546-552, 2002.
- BRINKER, Janine Cristina. Prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães das áreas urbana e rural do município de Caxias do sul, Rio Grande do Sul. 2012.
- CAETANO-DA-SILVA, Andrea et al. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1329-1336, 2004.
- COLLANTES-FERNÁNDEZ, Esther et al. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, 2002.
- CORBELLINI, L.G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.195-202, 2002.
- DIJKSTRA, T., M. EYSKER, G. SCHARES, F. J. CONRATHS, W. WOUDA, and H. W. BARKEMA. 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **Int. J. Parasitol.** 31:747-752
- DUBEY J.P. & SCHARES G. 2011. Neosporosis in animals: The last five years. **Vet. Parasitol.** 180:90-108.

- DUBEY J.P., CARPENTER J.L., SPEER C.A., TOPPER M.J. & UGGLA A. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 192:1269-1285.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 59, 1996.
- DUBEY, J.P. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, 84:349-367.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J.P., BUXTON, D., WOUDA, W., 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. **J. 499 Comp. Pathol.** 134, 267–289
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- DUBEY, J.P., LINSAY, D.S., 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.** 2, 230–233.
- DUBEY, J.P.; BARR,B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY,D.; OMATA,Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.
- FERRE, Ignacio et al. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-1518, 2005.
- GONDIM LF, McALLISTER MM, PITT WC, ZEMLICKA DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol** 34: 159-161, 2004.

- GONDIM LFP, PINHEIRO AM, SANTOS PO, JESUS EE, RIBEIRO MB, FERNANDES HS, ALMEIDA MA, FREIRE SM, MEYER R, McALLISTER MM. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Vet Parasitol** 101: 1-7, 2001
- GONDIM, L.F.P. et al. Soroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, p.71-75, 1999.
- GUEDES, Marlon H. Paiva et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 189-194, 2008.
- GUIMARÃES, JS; SOUZA, SLP; BERGAMASCHI, DP; GENNARI, SM Prevalência de *Neospora caninum* anticorpos e fatores associados à sua presença no gado leiteiro do norte do estado do Paraná, Brasil. **Parasitologia Veterinária**, v 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.
- GUY, C. S., WILLIAMS, D. J. L., KELLY, D. F., MCGARRY, J. W., GUY, F., BJORKMAN, C., SMITH, R. F. & TREES, A. J. (2001). *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. **The Veterinary Record**, 149, 443-449.
- HEMPHILL A. 1999. The host-parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, 43, 47-104.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A European perspective on *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 8, p. 877-924, 2000.
- HERNANDEZ, Jorge; RISCO, Carlos; DONOVAN, Arthur. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 5, p. 632-635, 2001.
- IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/> Acesso em: 27 março. 2014
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário**, 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13 abril. 2014

- KING, J.S., SLAPETA, J., JENKINS, D.J., AL-QASSAB, S.E., ELLIS, J.T., WINDSOR, P.A., 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology** 40, 945–950.
- LLANO, H. A. B. ; Caetano da silva, A . Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas leiteiras da microregião leste de Antioquia-Colômbia. In: XXIII Congresso brasileiro de parasitologia, 2013, Florianópolis. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2013.
- LINDSAY D.S. & DUBEY J.P. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **Am. J. Vet. Res.** 50:1981-1983.
- LINDSAY, D. S., E. J. KELLY, R. MCKOWN, F. J. STEIN, J. PLOZER, J. HERMAN, B. L. BLAGBURN, and J. P. DUBEY. 1996. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **J. Parasitol.** 82:657-659.
- LINDSAY, D. S., J. P. DUBEY, and R. B. DUNCAN. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.** 82:327-333.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis. **Journal of Veterinary**
- McALLISTER M.M., McGUIRE A.M., JOLLEY W.R., LINDSAY D.S., TREES A.J. & STOBART R.H. 1996. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Vet. Pathol.** 33(6):647-655.
- McALLISTER MM, HUFFMAN EM, HIETALA SK, CONRAD PA, ANDERSON ML, SALMAN MD: Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **J Vet Diagn Invest** 8:355-357, 1996
- 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 of Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.
- NETO, A. F. A.; BANDINI, L. A.; NISHI, S. M.; SOARES, R. M.; DRIEMEIER, D.; ANTONIASSI, N. A. B.; SCHARES, G.; GENNARI, S. M. Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. **Journal of Parasitology**, v. 97, p. 135-139, 2011.

- PETERSEN, E., M. LEBECH, L. JENSEN, P. LIND, M. RASK, P. BAGGER, C. BJÖRKMAN, and A. UGGLA. 1999. Neospora caninum infection and repeated abortions in humans. **Emerg. Infect. Dis.**5:278-280.
- PIAGENTINI, Marcelo. Dinâmica da infecção por Neospora caninum em rebanhos leiteiros do município de Avaré/SP. 2003.
- SOUSA, M. E.; WAGNER, J. N.; ALBUQUERQUE, P. P.; SOUZA NETO, O. L.; FARIA, E. B.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Seroprevalence and risk factors associated with infection by Neospora caninum of dairy cattle in the state of Alagoas, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.10, 1009-1013, 2012.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial do presente trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

WILLIAN CRISTOF CORREIA QUEIROZ

WILLIAM.CRISTOF1@GMAIL.COM

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

UNÁI-MG