



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CULTURAS DE CÉLULAS DO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATO INFECTADAS COM
NEOSPORA CANINUM

TESE DE DOUTORADO

ALEXANDRE MORAES PINHEIRO

SALVADOR
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CULTURAS DE CÉLULAS DO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATO INFECTADAS COM
NEOSPORA CANINUM

ALEXANDRE MORAES PINHEIRO

ORIENTADOR: MARIA DE FÁTIMA DIAS COSTA
Co-orientador: SILVIA LIMA COSTA

SALVADOR BAHIA - 2006

RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CULTURAS DE CÉLULAS DO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATO INFECTADAS COM
NEOSPORA CANINUM

ALEXANDRE MORAES PINHEIRO

Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Imunologia da
Universidade Federal da Bahia como
requisito para a obtenção do Título de
Doutor em Imunologia

SALVADOR Bahia - 2006

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do ICS / UFBA – Salvador – Bahia

P654 Pinheiro, Alexandre Moraes,
Resposta imune celular em culturas de células do sistema nervoso
central do rato infectados com *Neospora Caninum* / Alexandre Moraes
Pinheiro. – Salvador, 2006.
103 f. ; il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2006.

Orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa.
Co-Orientador: Profa. Dra. Silvia Lima Costa

1. *Neospora caninum*. 2. Sistema nervoso central. 3. Astrócitos. 4.
Neuroglia. 5. Resposta imune. I. Costa, Maria de Fátima Dias. II. Costa,
Silvia Lima. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 57.083.3: 616.8

Sabedoria é ter vergonha dos seus erros, mas não de corrigi-los. (Confucio)

AGRADECIMENTOS

À Dra Marcienne Bloch Tardy, por sempre instigar o meu crescimento científico.

Ao Dr Luiz Erlon Araújo Rodrigues, pelos ensinamentos nos experimentos da respiração celular.

À Dra. Songeli M. Freire, pelo auxílio nas questões imunológicas.

À Dra. Maria Ângela Ornelas Almeida, pelas orientações durante os anos de convívio.

Ao Dr. Ramon dos Santos El-Bachá, pelo apoio constante.

Aos funcionários, técnicos e pesquisadores do LabNq (ICS), LDPA (EMEV), LabImuno (ICS) e do Laboratório de Pesquisas Básicas (EBMSP).

À Cátia, pela presença e paciência.

Aos amigos, sempre presentes nas horas difíceis: Mônica, Virginia, Selma, Silvinha, Érica, Vera, Keu, Victor, Ana Rita, e Cláudia.

À todos que participaram de uma forma direta ou indireta para a conclusão do trabalho.

A Dra. Silvia Lima Costa pelos incentivos e eterna paciência, durante a realização deste trabalho.

A Dra. Maria de Fátima Dias Costa, pela presença constante e conselhos oportunos, não somente durante essa orientação, mas em toda a minha vida acadêmica.

**Aos meus Pais, exemplo de vida e
dedicação sagro esse trabalho.**

RESUMO

A neosporose é causada pelo *Neospora caninum*, parasito intracelular que acomete várias espécies animais, acarretando, dentre outras manifestações, abortamentos e comprometimentos neuro-musculares. Com o intuito de melhor compreender aspectos da resposta imune desse parasito, especialmente sua correlação com o sistema imunológico, desenvolveu-se um modelo experimental de infecção utilizando-se culturas de células gliais de rato. As células gliais desempenham importante papel no equilíbrio homeostático, nutrição, bem como, na resposta imune, sendo a cooperação entre os neurônios e a glia, essencial para o desenvolvimento e perfeito funcionamento do sistema nervoso central (SNC). O modelo foi inicialmente bem estabelecido quanto ao tempo e carga parasitária utilizados na infecção, estudando-se a seguir a expressão *in vitro* de citocinas; evidenciou-se que as culturas gliais respondem à infecção com uma modificação em sua morfologia, caracterizada por aumento do corpo celular e reorganização dos filamentos intermediários. Astrócitos em culturas infectadas por períodos de 24 e 72 h, expressaram Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico (NO), bem como, liberaram intensamente Interleucina 10 (IL-10), além de apresentarem aumento da atividade da lactato desidrogenase. Para melhor verificar o metabolismo respiratório das células gliais infectadas, procedeu-se ao estudo polarográfico do consumo de oxigênio, o qual não se alterou sob ação do parasito. Culturas mistas contendo cerca de 86% de astrócitos e 12% de microglia, foram também avaliadas quanto à resposta imune frente ao *N. caninum*, sendo observada a liberação de TNF- α e NO, além de uma superexpressão de IL 10 e IL-6. Em ambas as

culturas, não se observou liberação de Interferon gama (INF- γ), provavelmente em decorrência da modulação imposta pela IL-10. Os modelos mostraram-se adequados para avaliar a infecção pelo *N.* sobre o SNC, evidenciando que as células gliais reagem ao parasito com um padrão predominante de resposta Th2.

ABSTRACT

Neosporosis is a disease caused by *Neospora caninum*, an intracellular parasite that infects a wide range of animals, causes abortion in cattle, and neurologic disease in dogs. To study the pathogenic effects of this parasite, especially its correlation with the immunological system, we described a model of infection *in vitro*, using rat glial cells. Glial cells are responsible for homeostasis, nutrition, as well as by the immune response. Interactions between neurons and glia are essential to the development and function of the central nervous system (CNS). The model was well established, concerning the dose and time for infection and the expression of cytokines; infected glial cultures show modification in morphology, characterized by the large cell bodies and intermediate filament reorganization. Astrocytes infected for 24 and 72h release TNF- α and NO, as well as, high levels of IL-10 and have increased lactate dehydrogenase activity. Infected glial cells, were also studied on its respiratory metabolism, by polarography, in order to evaluate the consumption of oxygen but, no changes were seen, when compared with control. Mixed glial cultures with about 86% of astrocytes and 12% of microglia, were analyzed for the immune response, when infected by the *N. caninum*, these cultures released TNF- α and NO, as well as high levels of IL-10 and IL-6. In both kinds of cultures, IFN- γ was not detected, probably in function of the high levels of IL-10. All models are adequate to study the effects of neosporosis in the CNS where infected glial cells with *N. caninum* show a Th2 type response.

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	1
II	REVISÃO DE LITERATURA	3
1	AGENTE ETIOLÓGICO	3
1.1	Biologia do <i>Neospora caninum</i>	5
1.2	Formas de transmissão	6
2	SINAIS CLÍNICOS	8
3	IMUNOLOGIA NA NEOSPOROSE	10
3.1	Resposta imune à neosporose na gestação	12
3.2	Resposta imune no SNC	14
4	Diagnóstico	15
5	Vacinação	19
6	O sistema Nervoso Central	20
6.1	Os astrócitos	21
6.1.1	Astrócitos e imunidade	24
6.2	Oligodentrócitos	25
6.3	Microglia	25
6.4	Respiração celular	29
6.5	SNC e citocinas	30
III	OBJETIVOS	34
1	Objetivo geral	34
2	Objetivos específicos	34
IV	RESULTADOS	35
V	DISCUSSÃO	67
VI	CONCLUSÕES	72
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

BFGF – Fator básico de crescimento de fibroblasto

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

GDNF - Fator neurotrófico derivado de linhagens de células da glia

GFAP – Proteína ácida do gliofilamento

GM-CSF – Fator estimulante de granulócito

Gro A – Proteína α relacionada ao crescimento

HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão

ICAM-1 – Molécula intercelular de adesão 1

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina G

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-3 – Interleucina 3

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-18 – Interleucina 18

IFN- γ - Interferon gama

LCA – Antígeno comum de leucocito

LFA cadeia α/β - Molécula de superfície CD11b

LPS - Lipopolissacarideo

MCP-1 – Proteína 1 de quimioatração a monocitos

M-CSF – Fator estimulante de macrófago

MHC I – Complexo principal de histocompatibilidade classe I

MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade classe II

NGF – Fator de crescimento neural

NO – óxido nítrico

NT-3 – Neutrofina 3

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PGE₂ – Prostaglandina E 2

PGF₂ α - Prostaglandina F 2 α

pH – potencial hidrogenionico

S100 β - marcador fenotípico de astrócito

SNC – Sistema nervoso central

T CD8⁺ - Linfocito T CD8⁺

T CD4⁺ - Linfocito T CD4⁺

TGF- β - Fator de crescimento tumoral β

Th1 – Resposta imune de células T auxiliares do tipo 1

Th2 - Resposta imune de células T auxiliares do tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

VLA-4 – Antígeno de ativação muito tardia 4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das funções fisiológicas atribuídas aos astróctos e correlações com outros tipos celulares. _____23

Figura 2 - Principais peptídios e proteínas expressos por astrócitos reativos e seus papeis. _____24

Figura 3 – Caminhos da ativação microglial e correlações com estado fisiopatológico do cérebro _____28

Figura 4 – Interações das células gliais com o sistema imunológico. _____33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Receptores Expressos por células microgliais _____ 28

Tabela 2 – Fatores liberados por microglia ativada _____ 29

I. INTRODUÇÃO

Neospora caninum (*N. caninum*) é o protozoário causador da neosporose, doença que afeta principalmente bovinos e caninos. Desde os relatos primordiais feitos em 1984 por Bjerkas *et al.* e seu isolamento a partir dos trabalhos de Dubey *et al.* (1988a), este parasita tem sido identificado em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (Gondim *et al.*, 1999; Dubey, 2003).

Em bovinos, a doença se caracteriza por abortamentos, sendo considerada uma das principais causas de aborto nesta espécie (O'toole & Jeffrey, 1987; Parish *et al.*, 1987; Shivaprasad *et al.*, 1989; Thilsted & Dubey, 1989; Anderson *et al.*, 1991; Dubey, 1999). Nos caninos, identificados como hospedeiros definitivos, esta parasitose causa alterações neuromusculares, caracterizadas por paresia dos membros posteriores, normalmente ascendente, polirradiculite e meningoencefalite disseminada. Os casos mais graves são encontrados em cães jovens. (McAllister *et al.*, 1998).

Os dados referentes à resposta imune frente à neosporose são escassos na literatura, ao contrário dos conhecimentos sobre a infecção causada pelo *Toxoplasma gondii*, parasita em muito assemelhado ao *N. caninum*. Nos últimos anos, vários estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de melhor compreender a neosporose e sua correlação com o sistema imunológico. Sabe-se que a resposta imunológica frente ao *N. caninum* se caracteriza por um padrão de citocinas de perfil Th1 (Innes *et al.*, 1995; Khan *et al.*,

1997). Citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e o Interferon γ (IFN γ), diminuem a multiplicação de taquizoítos “*in vitro*” (Innes *et al.*, 1995; Yamane *et al.*, 2000).

Apesar do tropismo do *N. caninum* pelo sistema nervoso central (SNC), pouco se conhece sobre o comprometimento das células deste sistema na neosporose. O SNC pode ser subdividido em neurônios e células da glia. Essas últimas compreendem cerca de 90% do total de células e se subdividem em macroglia e microglia. A macroglia é constituída pelos astrócitos e pelos oligodendrocitos. Os astrócitos são os principais responsáveis pela homeostasia do SNC, enquanto os oligodendrocitos compõem a bainha de mielina dos neurônios. Já as células microgliais, apresentam origem hematopoiética e função imune-efetoras no SNC. Além desses tipos celulares, ainda podem ser encontrados as células ependimárias, que revestem as paredes internas dos ventrículos e demais cavidades nesse sistema. (Pham-Dinh, 1999; Gee & Keller, 2005).

Utilizando culturas de células gliais de ratos infectadas pelo *N. caninum*, este trabalho evidenciou aspectos imunopatogênicos da neosporose no tecido nervoso, estabelecendo parâmetros da infecção e as relações existentes entre este parasito e a glia.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. AGENTE ETIOLÓGICO

N. caninum é um protozoário apicomplexa, identificado pela primeira vez por Bjerkas *et al.* (1984), ao verificar que cães com alterações neuromusculares e sorologia negativa para toxoplasmose, apresentavam ao microscópio óptico, estruturas teciduais semelhantes ao *Toxoplasma gondii*.

Após este relato, um novo caso foi descrito por Hilali *et al.*, (1986), que identificaram um cisto em secções da medula espinhal de um canino, o qual também não apresentava reação a anticorpos anti-*T. gondii*. Mais tarde, Parish *et al.* (1987), assim como O'toole & Jeffrey (1987), relataram a infecção do SNC de bovinos por este parasito, então desconhecido.

Somente em 1988, o novo *sporozoa* foi classificado por Dubey *et al.* (1988a), ao estudar cortes histológicos de cães com suspeita de toxoplasmose. Neste mesmo ano, o recém classificado parasito é então isolado e mantido em laboratório (Dubey *et al.*,

1988b). Com isso, os primeiros testes imunológicos começaram a ser desenvolvidos para a identificação de anticorpos anti-*N. caninum*, utilizando-se a imunofluorescência indireta e a imunohistoquímica (Dubey *et al.*, 1988b; Lindsay & Dubey, 1989).

A confirmação da infecção em bovinos ocorreu em 1989, após os relatos de Shivaprasad *et al.* (1989), que identificaram *N. caninum* na placenta dessa espécie, enquanto que Thilsted & Dubey (1989), também o identificaram em um bezerro acometido de paralisia neonatal.

Anderson *et al.* (1991) e Barr *et al.* (1991) identificam *N. caninum* como a maior causa de abortos em bovinos leiteiros nos Estados Unidos. Conrad *et al.* (1993) conseguem o isolamento desse protozoário a partir de fetos bovinos abortados e nos anos seguintes, diversos casos foram descritos em vários países (Dubey & Lindsay, 1996; Gondim *et al.*, 1999; Hemphill *et al.*, 2000; Corbellini *et al.*, 2002).

Somente em 1998, o cão foi considerado o hospedeiro definitivo do *N. caninum* (McAllister *et al.*, 1998). Esses pesquisadores identificaram oocistos nas fezes de cães, após esses terem sido alimentados com tecidos de camundongos contendo cistos daquele parasito. Recentemente, Gondim *et al.* (2004) comprovaram a existência de um segundo hospedeiro definitivo, o coiote (*Canis latrans*), uma vez que filhotes dessa espécie, também eliminam oocistos, após serem alimentados com tecidos de bovinos infectados.

Este parasito pode apresentar como hospedeiros intermediários várias espécies, a exemplo dos bovinos, caprinos, eqüinos, ovinos, bubalinos, caninos e provavelmente outros homeotérmicos (Dubey, 1999, Dubey *et al.*, 2002). Em humanos, há histórico de anticorpos anti-*N. caninum*, contudo, não foram relatados casos da doença, apesar do seu potencial zoonótico (Tranas *et al.*, 1999; Omata *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2006). Marsh *et al.* (1998), propõem uma nova espécie - *Neospora hughesi*, isolada a partir de cavalos com mieloencefalite. Essa segunda espécie, até o momento, identificada no gênero *Neospora* também amplia as observações de seu comprometimento no tecido nervoso.

1.1 BIOLOGIA DO *Neospora caninum*

O *N. caninum* apresenta três formas infectantes, a saber: os taquizoítos, formas de proliferação rápida, os cistos teciduais, os quais se encontram cheios de bradizoítos e os oocistos (Dubey *et al.*, 1988a; McAllister *et al.*, 1998).

As formas encontradas nos hospedeiros intermediários são os cistos e os taquizoítos, sendo que aqueles são encontrados principalmente no sistema nervoso central (Dubey *et al.*, 1988a; Dubey *et al.*, 1990; McAllister *et al.*, 1999), tendo sido recentemente identificados também em músculo esquelético de cães e bezerros (Peters *et al.*, 2001).

Ambos foram encontrados em outras espécies, a exemplo de caprinos, ovinos e eqüinos . (Dubey, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005).

Os cistos são redondos ou ovais, podendo medir até 107 μm (Dubey & Lindsay, 1996). Apresentam uma parede bem espessa, podendo chegar a 4 μm (Dubey & Lindsay, 1996; Speer *et al.*, 1999). No interior dos cistos, são encontrados os bradizoítos, que apresentam multiplicação lenta e medem de 6-8 x 1-2 μm (Dubey & Lindsay, 1996; Speer *et al.*, 1999).

Os taquizoítos são ovóides, redondos ou têm forma de meia lua. Medem de 3 -7 x 1-5 μm , dependendo do estágio em que se encontram (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey *et al.*, 2002). Essas formas infectantes foram encontradas em vários tecidos, dentre os quais coração, pulmões, fígado, músculos esqueléticos, rins, pele, placenta, medula espinhal e cérebro (Dubey *et al.*, 1988; Dubey *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 2001).

Os taquizoítos invadem células hospedeiras, multiplicando-se no citoplasma em vacúolos parasitóforos, formados com a membrana plasmática do hospedeiro, o que leva ao rompimento de células e desencadeia lesões (Buxton *et al.*,2002).

O oocisto de *N. caninum* pode se apresentar de forma esporulada ou não esporulada. Quando não esporulado, logo após a sua eliminação, mede de 10 a 11 μm de diâmetro. Os oocistos esporulados, dois a três dias após a sua eliminação, contém dois

esporocistos de 8 x 6 µm e cada um deles, contém quatro esporozoítos de 7-8 x 2-3 µm (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999;).

1.2 FORMAS DE TRANSMISSÃO

N. caninum se dissemina tanto por transmissão horizontal, como por transmissão vertical. A transmissão horizontal refere-se àquela que ocorre quando o hospedeiro se infecta pela ingestão de alimento ou água contaminada por uma das formas infectantes do agente. Já a transmissão vertical, é àquela que ocorre por via transplacentária.

A transmissão horizontal pode ocorrer tanto de cães para outras espécies, assim como de outras espécies, para o cão. Os cães podem contaminar pastagens ou silagem com oocistos que são ingeridos por bovinos. Por sua vez podem se infectar ao se alimentarem de placentas infectadas ou restos de abortos de bovinos acometidos de neosporose (McAllister *et al.*, 1999; Dijkstra *et al.*, 2001).

Suspeita-se que a transmissão horizontal também deva existir entre espécies selvagens, uma vez que a infecção ocorre em animais silvestres (Woods *et al.*, 1994; Dubey *et al.* 1996b) e que canídeos silvestres apresentam sorologia positiva, sendo recentemente também identificados como hospedeiros definitivos, eliminando oocistos (Lindsay *et al.*, 1996; Barber *et al.*, 1997; Gondim *et al.*, 2004).

A transmissão vertical, aquela que ocorre de mãe para filho, foi demonstrada em várias espécies animais (Buxton *et al.*, 2002), sendo a principal forma de infecção de bovinos (Pare *et al.*, 1996; Schares *et al.*, 1998; Dijkstra *et al.*, 2001). Pouco se sabe, contudo, sobre os fatores que determinam esse tipo de transmissão transplacentária (Hemphill *et al.*, 2000).

Em cães, a maioria dos casos de neosporose ocorre por infecção vertical (Bjerkas *et al.*, 1984; Dubey *et al.*, 1988b; Dubey & Lindsay 1989; Dubey *et al.*, 1990b;), apesar de Barber & Trees (1998) afirmarem que a transmissão natural do parasito por essa via é baixa, uma vez que, ao testaram 179 filhotes de cadelas soropositivas, apenas 20 % eram positivos e somente 3 % apresentaram sinais clínicos.

A transmissão vertical também foi observada em ovinos, caprinos e eqüinos (Dubey *et al.*, 1990a; Dubey & Porterfield, 1990; Barr *et al.*, 1992, Kobayashi *et al.*, 2001; Corbellini *et al.*, 2001;).

2. SINAIS CLÍNICOS

Os casos mais graves de neosporose ocorrem em cães jovens infectados por transmissão vertical, expressando-se por severo comprometimento neuromuscular. Em bovinos, apesar de a doença ser causadora de abortamentos (Dubey & Lindsay, 1996;

Dubey 1999), esse parasito pode também causar doença neuromuscular em bezerros, destruindo grande quantidade de células nervosas, inclusive no sistema nervoso central, comprometendo a função das células remanescentes (Dubey & De Lahunta, 1993).

A doença pode ser localizada ou generalizada e aparentemente todos os tecidos podem ser comprometidos, inclusive a pele (Hoskins *et al.*, 1991; Dubey *et al.*, 1995; Dubey *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 2000).

Cães jovens podem apresentar paresia dos membros posteriores, normalmente ascendente, polirradiculite e meningoencefalite disseminada (Dubey & Lindsay, 1996; Peters *et al.*, 2000). Os membros posteriores são mais afetados do que os anteriores e podem apresentar uma hiperextensão rígida (Barber *et al.*, 1996). Outras disfunções podem ocorrer como paralisia da mandíbula, atrofia muscular e problemas cardíacos (Hay *et al.*, 1990; Odin & Dubey, 1993).

Os sinais neurológicos vão depender da região afetada (Jackson *et al.*, 1995). A necropsia de cães com neosporose demonstrou encefalomielite, meningoencefalite, miosite, polimiosite e polirradiculoneurite associadas ao *N. caninum* (Dubey & Lindsay, 1996).

Aborto é o único sinal clínico observado em bovinos adultos (Anderson *et al.*, 1994; Dubey & Lindsay, 1996), podendo ocorrer a partir do terceiro mês de gestação, tendo

sido já relatado em diferentes períodos (Wren, 1999). O feto pode morrer no útero, ser reabsorvido, mumificado, autolizado ou nascer doente (Dubey & Lindsay, 1996; Hemphill *et al.*, 2000).

As lesões nos fetos podem estar em vários tecidos, contudo, lesões degenerativas e inflamatórias são mais comuns no SNC, coração, músculo esquelético e fígado (Barr *et al.*, 1990; Barr *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1991; Wouda, 1997). As lesões neurológicas se caracterizam por infiltração multifocal não supurativa, com ou sem necrose e infiltração leucocitária difusa, ou ainda, lesões multifocais não supurativas da meninge. A lesão característica da neosporose no SNC, consiste numa infiltração mononuclear ao redor da área central de necrose. A proliferação glial foi observada mais comumente em fetos abortados no terço final de gestação (Dubey & Lindsay, 1996).

3. IMUNOLOGIA NA NEOSPOROSE

Sendo *N. caninum* um protozoário intracelular obrigatório, a resposta imune mediada por células desempenha um importante papel frente à infecção. Essa constatação foi inicialmente feita por Innes *et al.* (1995), quando observaram que células tratadas “*in vitro*” com IFN- γ apresentavam inibição na multiplicação do parasito, quando comparadas com aquelas não tratadas.

Da mesma forma, a IL-12 participa de forma decisiva na resposta do hospedeiro frente ao parasito, uma vez que é parcialmente responsável pela ativação de células T. Khan *et al.*, em 1997, observaram que quando tratavam ratos com anticorpo monoclonal anti IL-12, os animais morriam sete dias após a infecção, o que os fez concluir que esses animais deveriam apresentar um aumento dos níveis de IL-10, já que esta é modulada por IL-12.

A importância da IL-12 e do IFN γ no controle da infecção de camundongos por *N. caninum*, foi também demonstrada por Baszler *et al.* (1999). Outra importante observação nesse sentido, é que camundongos *knockout* para IFN- γ apresentam-se mais susceptíveis à infecção (Dubey *et al.*, 1998).

Em camundongos Balb c infectados com *N. caninum*, a proteção de células T CD4⁺ é mais importante que a de células T CD8⁺ e o IFN γ têm expressão significativa no início da infecção por este parasito (Tanaka *et al.*, 2000), Estes autores também observaram que células T CD4⁺ são essenciais para a produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum* em estágios tardios de infecção, induzindo assim outros mecanismos de proteção (Tanaka *et al.*, 2000).

Por outro lado, Spencer *et al.* (2005) perceberam que as células T CD8⁺ demonstraram uma maior proteção na infecção deste parasito que as células T CD4⁺, ao tentarem transferir imunidade protetora para camundongos Balb c infectados.

O papel dos anticorpos na neosporose não está suficientemente esclarecido. Acredita-se que atuem em taquizoítos situados extracelularmente (Innes *et al.*, 2002). Uma resposta de anticorpos IgG 2a anti-*N. caninum*, foi encontrada em bovinos infectados experimentalmente (Williams *et al.*, 2000).

Estudos mostram que tanto a imunidade inata, quanto a adquirida, estão envolvidas na resistência a neosporose (Eperon *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Long & Baszler., 2000; Nishikawa *et al.*, 2003). Existem evidências que demonstram que, enquanto uma resposta Th1 está relacionada a uma infecção aguda pelo *N. caninum* (Khan *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999; Ritter *et al.*, 2002), uma resposta Th2 está diretamente relacionada à susceptibilidade à doença (Long & Baszler, 2000; Nishikawa *et al.*, 2003). Além disso, células T CD4⁺ citotóxicas foram encontradas envolvidas na resposta imune de bovinos contra o *N. caninum* (Staska *et al.*, 2003).

Em 2005, Teixeira *et al.* caracterizaram a resposta de células B em Balb c infectados, demonstrando que estas células foram estimuladas por taquizoítos. Isso corrobora com achados de Eperon *et al.* (1999), que mostraram que camundongos deficientes em células B são mais susceptíveis à infecção pelo *N. caninum* que os selvagens, indicando uma imunidade protetora dessas células, contra a neosporose.

3.1 RESPOSTA IMUNE À NEOSPOROSE NA GESTAÇÃO

A resposta imune à neosporose durante a gestação, se caracteriza de diferentes formas, dependendo do período gestacional. Se a infecção ocorrer durante a fase inicial, muito provavelmente ocorrerá um aborto (Barr *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 2000). Caso a infecção ocorra no período intermediário, o feto pode ser abortado ou nascer com a infecção. Infecções no último estágio da gravidez, no entanto, pouco predispõem ao aborto, porém, em contrapartida, o recém nato estará infectado, sem apresentar sintomatologia clínica (Innes *et al.*, 2002).

Acredita-se que a ocorrência do aborto provocada pela neosporose na fase inicial da gestação, deve-se a uma resposta imune ineficaz do feto. Em contrapartida, a mãe é capaz de uma resposta imune celular proliferativa forte, com produção de IFN γ em resposta aos antígenos (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2002). Muito provavelmente, o aborto ocorre pelos efeitos deletérios do IFN- γ sobre a gestação (Chaouat *et al.*, 1995; Innes *et al.*, 2005). Além desses efeitos negativos do IFN- γ , células T γ δ , células T CD4⁺ e células T CD8⁺ foram encontradas em infiltrados, na placenta de fêmeas parasitadas pelo *N.caninum* (Innes *et al.*, 2005).

A importância de citocinas como IL-4 e IL-10 durante a gestação, foi demonstrada recentemente. Ratos, no início da gestação, apresentaram uma diminuição da infecção transplacentária, quando infectados juntamente com anticorpos monoclonais para IL-4 (Long & Baszler, 2000). Em acréscimo, a manutenção da gestação foi demonstrada com a administração de IL-4 e IL-10 (Wegmann *et al.*, 1993; Chaouat *et al.*, 1995).

No terço médio da gestação começa a existir uma resposta imunológica proveniente do feto e da placenta. Isso contribui para uma resposta do padrão Th2 no ambiente de comunicação entre o feto e sua mãe (Innes *et al.*, 2002). Esplenócitos de fetos com 130 dias de gestação, apresentaram altos níveis de transcrição para genes de IFN γ , TNF α e IL-10, quando comparados com fetos não infectados (Almeria *et al.*, 2003).

Como se sabe, IL-10 regula negativamente IFN γ (Entrican, 2002), sendo este um mecanismo para reduzir a produção de níveis tóxicos de citocinas inflamatórias (Quinn, 2004). Devido a essa importante resposta imune fetal, vários estudos indicam que o momento da infecção do feto ou da placenta, é de fundamental importância para o resultado da gestação (Barr *et al.*, 1991; Buxton *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000).

No terço final da gestação, o feto já apresenta uma maturidade do sistema imunológico e por isso, dificilmente a infecção provoca o aborto, havendo provavelmente uma mudança na dinâmica parasito / hospedeiro. Estudos sugerem que uma resposta Th1 compromete a gestação, enquanto que uma resposta Th2 localizada, pode favorecê-la (Quinn *et al.*, 2004; Innes *et al.*, 2005).

3.2 RESPOSTA IMUNE NO SNC

Pouco se sabe sobre a resposta imune localizada no SNC, frente à neosporose. Yamane *et al.* (2000) estudaram a susceptibilidade de culturas de células do SNC de bovinos ao *N. caninum*, observando que ao tratar com TNF α e IFN γ culturas dessas células, obtidas de fetos com 100 a 240 dias de gestação, os taquizoítos tinham o seu crescimento inibido. Foi ainda observado que os parasitos estavam predominantemente no citoplasma das células gliais, nas culturas constituídas por aproximadamente 60-70 % de neurônios, 10-15 % de astrócitos, 5 % de microglia e 20 % de células que não foram identificadas pelos marcadores utilizados.

Bartley *et al.* (2004), verificaram uma resposta imune celular específica dos linfonodos retrofaringeanos de animais infectados com *N. caninum*, os quais recebem a drenagem linfática do cérebro, sendo identificada uma predominância de células T CD4⁺ nesses gânglios.

Spencer *et al.* (2005), inocularam células T CD8⁺ em camundongos e verificaram que estas promoveram sinais neurológicos severos tais como, ataxia, inabilidade para localizar o alimento ou água, movimentos circulares e eriçamento de pelos em região cervical. Entretanto, no mesmo estudo, animais que receberam células T CD4⁺ também apresentaram ataxia e outras alterações neurológicas, o que levou os autores a supor que os sinais observados nos animais que receberam células T CD8⁺, fossem provenientes de um excesso desse tipo celular e da sua circulação, após a transferência da imunidade. Durante infecções agudas, células CD8⁺ atuam primariamente como células citotóxicas limitando a disseminação do parasito, por

reconhecimento direto de células infectadas pelo MHC classe I ou pela ação de citocinas. Um excesso desse tipo celular pode levar a uma destruição exacerbada ou a liberação de citocinas levando a sinais neurológicos severos.

4. DIAGNÓSTICO

Desde o isolamento do *N. caninum*, uma série de testes vêm sendo descritos e aperfeiçoados para diagnóstico da neosporose. Inicialmente, esse diagnóstico era feito pela identificação do agente nos tecidos, por microscopia eletrônica. O primeiro teste descrito para a identificação de anticorpos anti *N. caninum* foi a imunofluorescência indireta (IFI) (Dubey *et al.*, 1988b). Logo no ano seguinte, Dubey & Lindsay (1989), utilizando soro de animais de laboratório infectados experimentalmente, desenvolveram um teste imunohistoquímico para facilitar o diagnóstico deste parasito, assim como a sua diferenciação de outros gêneros.

Vários testes sorológicos para a identificação de anticorpos anti *N. caninum* foram propostos: o teste de ELISA, o teste de aglutinação direta, a imunofluorescência, o Dot-ELISA e o *immunoblotting*. Além destes testes, a reação de polimerização em cadeia (PCR) e a imunohistoquímica também têm sido utilizadas para o diagnóstico. Sabendo que algumas espécies animais podem apresentar uma infecção latente e assintomática, esses testes são de grande importância para o diagnóstico dessa

enfermidade e seu controle epidemiológico (Bjorkman *et al.*, 1996; Barber & Trees, 1998).

O diagnóstico “post mortem” é feito pela demonstração do parasito em tecidos de animais doentes, após sua identificação pela imunohistoquímica. Na macroscopia observam-se áreas de necrose no SNC e fígado, além de granulomas e atrofia cerebelar. As principais lesões microscópicas são a encefalomielite e miosite. Ainda são observados meningoencefalite e polirradiculite em cães. Em fetos bovinos observa-se encefalomielite com infiltração multifocal não supurativa, com ou sem necrose multifocal e infiltração leucocitária não supurativa difusa das meninges. A lesão característica da neosporose no SNC consiste de um foco de infiltração mononuclear ao redor da área central de necrose (Dubey & Lindsay, 1996).

A IFI vem sendo utilizada como padrão ouro para o desenvolvimento de outros testes diagnósticos (Bjorkman & Uggla, 1999). Isso acontece porque antígenos de superfície são considerados os mais específicos no filo apicomplexa (Dubey *et al.*, 1996b; Williams *et al.*, 1997; Packham *et al.*, 1998; Bjorkman & Uggla, 1999).

O primeiro teste de ELISA padronizado foi descrito por Bjorkman *et al.* (1994). Desde então, várias tentativas de torná-lo mais sensível e específico têm sido feitas, incluindo modificações na forma de preparo do antígeno. Hoje existem testes de ELISA em que o antígeno empregado pode ser o taquizoíto inteiro (Williams *et al.*, 1997), o taquizoíto

sonicado (Pare *et al.*, 1995) e proteínas recombinantes de 30 e 35 kDa (Lally *et al.*, 1996).

A sensibilidade e especificidade destes testes são variáveis. Para o iscom-ELISA, sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 98 e 96% (Bjorkman *et al.*, 1999). Recentemente, Jenkins *et al.* (2005) propuseram um ELISA utilizando proteínas recombinantes purificadas por HPLC, denominado de NcGRA6s-ELISA, o qual apresentou um aumento da sensibilidade, bem como da especificidade, quando comparado com outros três antígenos brutos.

Um novo método, baseado em Dot-ELISA com antígenos solúveis de taquizoítos, foi desenvolvido por Pinheiro *et al.* (2005), tendo apresentado sensibilidade e especificidade de, respectivamente, de 87% e 100%, quando comparado com a IFI em um ponto de corte de 1:25.

O “immunoblotting” também tem sido utilizado como ferramenta para o estudo da resposta imune humoral. O reconhecimento antigênico de diversos polipeptídios (17, 29, 30, 37 kDa, dentre outros) tem contribuído para a identificação de diferentes estágios de infecção (Hemphill *et al.*, 1999; Schares *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 2001; Mineo *et al.*, 2001;). No mesmo sentido, Bjorkman *et al.* (1999) descreveram um ELISA de avides para a identificação do tempo de infecção em animais inoculados com taquizoítos por via intravenosa e recentemente, estudaram a avides de IgG de animais infectados com oocistos, por via oral (Bjorkman *et al.*, 2005).

O teste de aglutinação direta apresenta a grande vantagem de não necessitar de anticorpos secundários. Este teste foi descrito por Romand *et al.* (1998) e Packham *et al.* (1998), sendo observadas sensibilidade e especificidade semelhantes as da IFI (Bjorkman *et al.*, 1999).

Apesar de a sorologia significar um grande avanço na identificação de animais soropositivos, somente animais com títulos elevados poderiam ser considerados doentes (Dubey *et al.*, 1998). Devido a isso, métodos mais sensíveis para a identificação do agente, como a PCR e a imunohistoquímica, se apresentam de grande importância.

A PCR vem sendo utilizada para a identificação do *N. caninum* a partir de tecidos de fetos abortados, placenta, líquido amniótico, bem como, para a identificação de oocistos em fezes de animais domésticos ou selvagens (Ho *et al.*, 1996; Dubey, 1999; Bergeron *et al.*, 2001; Basso *et al.*, 2001;). A grande vantagem dessa técnica é a possibilidade da identificação de pequenas quantidades do agente em grandes áreas teciduais. Contudo, custo, tempo e equipamentos específicos, são fatores limitantes para uso desse procedimento (Anderson *et al.*, 2000).

Outra possibilidade para o diagnóstico é o isolamento do agente em cultivo celular ou a partir de animais de laboratório. Para tanto, tecidos de animais suspeitos são inoculados em cultivo celular ou em camundongos imunossuprimidos, gerbil e *knockout*

para IFN γ (Yamane *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 2000; Gondim *et al.*, 2001).

5. VACINAÇÃO

Alguns estudos têm proposto diferentes estratégias de vacinação para o controle da neosporose e atualmente, dispõe-se comercialmente de uma vacina preparada com antígenos mortos no controle da infecção, mesmo que apresente uma proteção de apenas 46% (Romero *et al.*, 2004). Alguns trabalhos demonstram, contudo, que vacinas com taquizóitos mortos, apesar de aumentarem a resposta imune celular e produção de IFN γ , não conseguiram impedir uma transmissão vertical do parasito (Andrianarivo *et al.*, 2005). Uma vacina utilizando antígenos inativados, durante a gestação, foi proposta por Moore *et al.* (2005), e os animais vacinados apresentaram níveis de anticorpos específicos e de IFN γ , em quantidades similares àqueles de animais naturalmente infectados. Sabe-se que animais vacinados e naturalmente infectados podem adquirir diferentes graus de imunidade protetora.

Pesquisas sobre a vacinação na neosporose têm como objetivo a inibição da transmissão congênita em bovinos que nunca tiveram contato com o *N. caninum* (Innes

et al., 2005). Em ratos, uma vacina purificada - proteína NcSRS2, demonstrou inibição da transmissão congênita (Haldorson *et al.*, 2005).

6. O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O tecido nervoso é caracterizado por sua estrutura complexa e heterogeneidade de tipos celulares, próximos entre si (Hansson, 1982). O SNC pode ser dividido em neurônios e células da glia. O termo neuroglia (cola do tecido nervoso) foi utilizado pela primeira vez em 1846 por Virchow, para definir uma substância de ligação do cérebro com a medula espinhal. Em 1893, Andriezen diferenciou a glia fibrosa, que se apresenta essencialmente na massa branca, da glia protoplasmática, rica na massa cinzenta. Por fim, devido a sua forma, Ramon & Cajal, em 1913, denominaram essas células gliais de astrócitos. Com a evolução das técnicas histológicas de Ramon & Cajal, outros elementos foram diferenciados, além de neurônios e astrócitos. Essas outras células, propostas por Del Rio Hortega (1919 – 1928) foram chamadas de oligodendrócitos e células microgliais (Hansson, 1982; Boulton *et al.*, 1992; Boumann & Pham-Dinh, 2001).

Assim, desde o início do século XX, três grandes tipos de células gliais já haviam sido identificadas no SNC. Estas foram agrupadas em macroglia, originárias do

neuroectoderma, que reúne os astrócitos e oligodendrócitos e microglia, de origem mesenquimatosa (Pham-Dinh, 1999).

Estudos desses diferentes tipos celulares, com as mais diversas técnicas, mostram que o SNC não é somente a soma de diferentes compartimentos isolados. Na verdade, mais que uma cooperação entre os neurônios e as células gliais, existe uma base essencial para o desenvolvimento e funcionamento perfeito desse sistema. A importância das células gliais é também sugerida por seu crescimento proporcional em diferentes espécies: essas células constituem cerca de 25% do total de células do SNC de drosófila, 65 % de roedores e 90 % do total de células do SNC do homem (Baumann & Pham-Dinh., 2001).

As células gliais são responsáveis por circundar o corpo celular, axônios e os dendritos dos neurônios, facilitando a transmissão do impulso nervoso, participando na separação e isolamento dos grupos neuronais e conexões sinápticas, promovendo fagocitose após a morte neuronal, promovendo a defesa, além de participar da captação de nutrientes, oxigênio e da homeostase do SNC (Tardy *et al.*, 1991; Letournel-Boulland *et al.*, 1994; Kandel *et al.*, 2000; Barres & Bardes, 2000).

6.1. OS ASTRÓCITOS

Os astrócitos constituem um conjunto de células que apresentam forma de estrela, daí o seu nome. A depender da sua localização, diversos fenótipos e funções podem ser descritos.

Morfologicamente os astrócitos podem ser subdivididos em astrócitos protoplasmáticos, ou do tipo I, predominantes na substância cinzenta e os astrócitos fibrosos, ou do tipo II, abundantes na substância branca (Butt & Ransom, 1993).

Os astrócitos protoplasmáticos apresentam numerosos prolongamentos, muito ramificados, finos e curtos. Os astrócitos fibrosos têm também prolongamentos numerosos, sendo, contudo, de grosso calibre e longos, quando comparados com os astrócitos protoplasmáticos (Privat *et al.*, 1995). A nomenclatura que se utiliza atualmente para os astrócitos baseia-se somente em diferenças morfológicas, uma vez que diferenças funcionais entre os dois tipos, não são conhecidas (Kriegstein & Gotz, 2003).

Os astrócitos apresentam um citoesqueleto de filamentos intermediários, constituído principalmente pela proteína ácida do gliofilamento (GFAP), a qual se constitui no marcador mais utilizado para a identificação desse tipo celular (Bignami *et al.*, 1972; Eng, 1985). Não se sabe exatamente a função da GFAP, contudo, alguns trabalhos mostram que ela está relacionada com a estabilização do citoesqueleto astrocitário e a manutenção da forma dessas células (Kimelberg, 2004). A vimentina e a nestina são também filamentos intermediários de astrócitos, os quais podem ser expressos

dependendo da idade de diferenciação e/ou reatividade celular (Eliasson *et al.*, 1999). Outros marcadores fenotípicos utilizados são ainda a glutamida sintetase e a S100 β (Kimmelberg, 2004).

Durante muito tempo, os astrócitos foram considerados como células de apoio, cujo principal objetivo seria o perfeito funcionamento neuronal. Atualmente, sabe-se que eles apresentam contatos com diferentes tipos celulares e desempenham diversas funções no desenvolvimento e na constituição do SNC, além do aporte energético aos neurônios e da manutenção da homeostasia extracelular, pelo controle da concentração iônica e do pH. Participam também da formação e manutenção da barreira hemato-encefálica, regulação da transmissão sináptica, neurogênese no adulto e desempenham ainda importantes papéis na defesa do sistema nervoso frente a diferentes agressões, sendo capazes de expressar receptores e mensageiros químicos diversos (Figuras 1 e 2) (Eddleston & Mucke, 1993; Van Wagoner & Benveniste, 1999; Baumann & Pham-Dinh, 2001;).

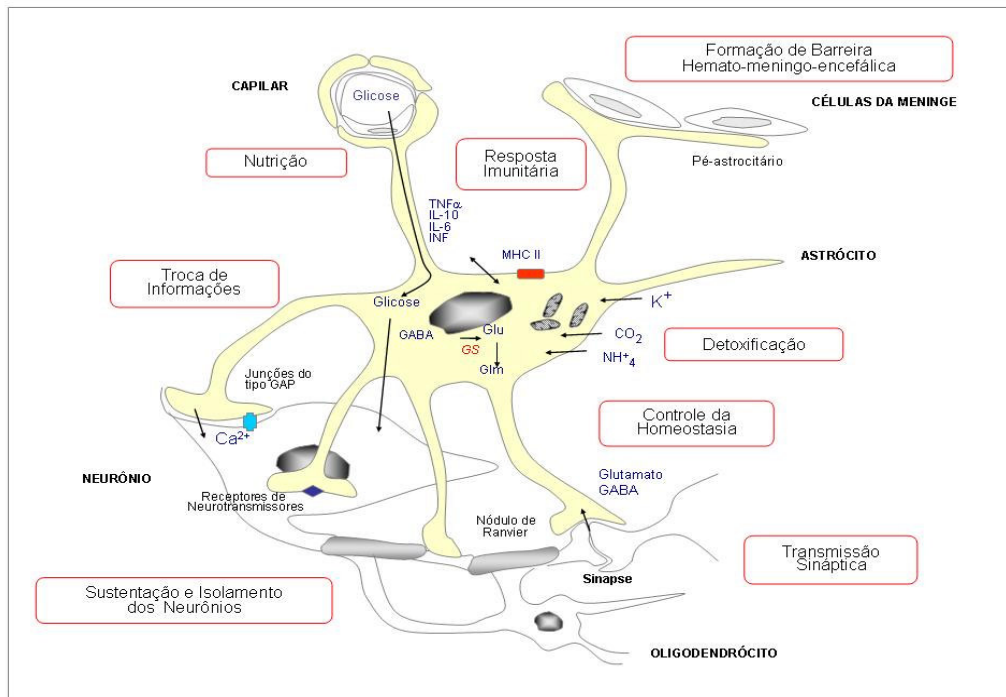


Figura 1 - Representação esquemática das funções fisiológicas atribuídas aos astrócitos e correlações com outros tipos celulares (Adaptado de Tardy 1991; Van Wagoner & Benveniste, 1999).

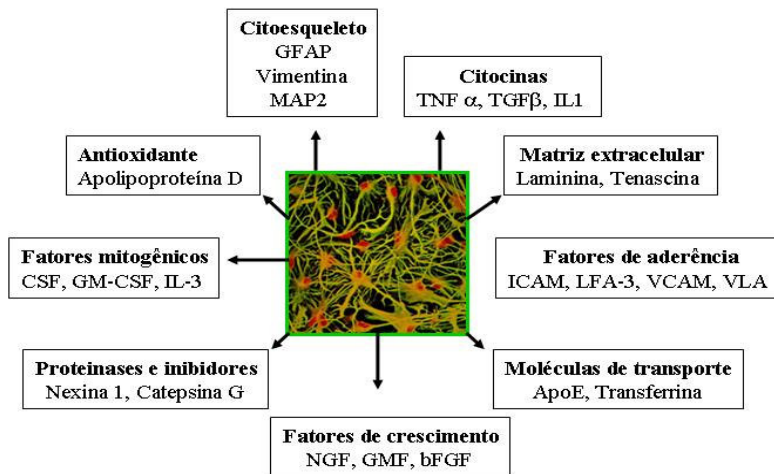


Figura 2 – Principais peptídios e proteínas expressos por astrócitos reativos e seus papéis. (Adaptado de Aloisi *et al.*, 1992; NoreMBERG, 1994; Tardy 2001)

6.1.1. ASTRÓCITOS E IMUNIDADE

Os astrócitos são considerados como importantes células de defesa do SNC. Van Wagoner & Benveniste (1999) relataram que essas células são potentes produtoras de citocinas e Gimsa *et al.* (2004) demonstraram que elas são capazes de suprimir a ativação, proliferação e a função de células T invasoras, além de atuar como apresentadoras de antígenos.

Os astrócitos são as primeiras células a responder a um ataque ou lesão no SNC (Norenberg, 1994) e sua reatividade caracteriza-se por astrogliose. Essas células são conhecidas por responder tanto a fatores inflamatórios, como imunes, desencadeando proliferação, liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão e apresentação de antígenos (Figura 2) (Selmaj *et al.*, 1990; Aloisi *et al.*, 1992; Eddleston & Mucke, 1993; Otero & Merrill, 1994; Norenberg, 1994).

6.2. OLIGODENDRÓCITOS

Os oligodendrócitos são responsáveis pela síntese de mielina no sistema nervoso, revestindo os axônios dessa importante bainha. Essas células se apresentam com densidade moderada, quando comparadas com os astrócitos, que são luminosos. Podem apresentar núcleos redondos, ovais ou irregulares (Hansson, 1982; Baumann & Pham-Dinh, 2001). Além disso, participam da regulação do pH e apresentam canais iônicos e receptores para neurotransmissores, os quais não têm função fisiológica completamente compreendida. Apesar de apresentarem funções na regulação do microambiente, essas células, assim como neurônios, não são muito resistentes a agressões (Lent, 2001).

6.3. MICROGLIA

As células microgliais são normalmente menores que os oligodendrócitos e os astrócitos. Essas células são fagócitos ativos e aumentam em quantidade, quando são estimuladas em diferentes situações, a exemplo das lesões (Hansson, 1982). São distribuídas por todo o sistema nervoso e representam cerca de 20 % de todas as células gliais. Do ponto de vista antigênico, se parecem com os monócitos e macrófagos, apresentando um grande número de marcadores, bem como propriedades comuns a essas células (Tabela 1). A microglia difere dos macrófagos por apresentar uma grande quantidade de canais iônicos e por produzir e secretar um grande número de fatores celulares, o que lhe confere um papel único no desenvolvimento, cicatrização e processos de reparo do sistema nervoso (Tabela 2) (Pham-Dinh, 1999). Uma outra diferença entre macrófagos e as células microgliais foi observada quando se estudou essas células por microscopia eletrônica, verificando-se em sua superfície, protusões características, as quais não são visualizadas em macrófagos (Vilhardt, 2005).

Ainda no tocante à morfologia, a microglia pode apresentar-se de forma amebóide ou ramificada. Esta última, parece relacionada com o repouso, uma vez que em lesões induzidas, a ativação dessas células resultou em contração dos processos celulares e “conversão” em uma forma amebóide típica dos macrófagos. (Vilhardt, 2005). Alguns autores consideram ainda que exista um estágio intermediário. Nesse estágio,

acontece uma hiper ramificação da microglia, o que seria o início do seu processo de ativação (Figura 3) (Streit *et al.*, 1999).

Segundo Vilhardt (2005), as células microgliais podem ser consideradas também células imaturas. Isso porque se diferenciam em macrófagos e células dendríticas, quando tratadas com fatores estimuladores de macrófagos e granulócitos (M-CSF e GM-CSF) (Fischer & Reichmann, 2001; Santambrogio *et al.*, 2001).

As funções da microglia são realçadas em dois momentos distintos: durante o desenvolvimento cerebral, esta apresenta uma função fagocítica sobre as células que estão em apoptose e com isso, envolve-se diretamente com o destino (morte/sobrevivência) dos neurônios (Vilhardt, 2005); já no cérebro adulto, quando a fagocitose não é marcante, a microglia se apresenta em “repouso”, com uma forma ramificada, promovendo suporte às células gliais e comunicação com neurônios. (Polazzi & Contestabile, 2002; Vilhardt, 2005;).

Na presença de uma patologia endógena como disfunção ou morte neuronal, agregações anormais de proteínas, interações imunológicas ou infecções exógenas, essas células são colocadas em sua forma ativa. Nesta forma, a função fagocítica e a expressão de diversos mediadores fazem com que a microglia responda de forma específica e apropriada. Algumas dessas funções são a proliferação celular, migração, fagocitose, apresentação de antígeno, expressão de receptores de superfície da resposta imune inata, secreção de mediadores pró-inflamatórios, como

prostaglandinas, citocinas e quimiocinas, secreção de proteases, geração de espécies reativas de oxigênio, intermediadores do nitrogênio e a secreção de citocinas antiinflamatórias como IL-10, TGF β e substâncias neurotróficas como neurotrofinas (Aloisi, 2001; Vilhardt, 2005). Contudo, deve-se salientar que apesar de ser considerada a primeira linha de defesa do SNC, mesmo em repouso, essas células apresentam importantes funções neurotróficas, interagindo com astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (Polazzi & Contestabile, 2002; Streit, 2002).

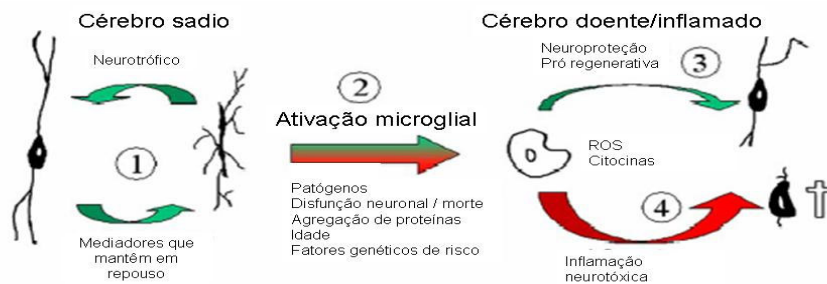


Figura 3 – Caminhos da ativação microglial e correlações com estado fisiopatológico do cérebro (Adaptado de Vilhardt, 2005; Streit *et al.*, 1999).

Tabela 1 – Receptores expressos pelas células microgliais (Adaptado de Vilhardt, 2005; Rock *et al.*, 2004)

Glicoconjugados com resíduos de α D galactose
CR3 (CD11b; Mac1)
CR4 (CD11c)
MHC I e MHC II
LCA (Antígeno comum de leucócitos)
LFA 1cadeia α (CD11a)
LFA 1cadeia β (CD18)
ICAM-1
VLA-4
Receptor Fc
F4/80

Tabela 2 – Fatores liberados pela microglia ativada (Adaptado de Vilhardt, 2005; Rock *et al.*, 2004)

bFGF
BDND
GDNF
Gro α
IL-1
IL-1 β
IL-3
IL-8
IL-12
IL-18
IFN γ
MCP-1
NGF
NO
NT-3
Plasminogene
PGE₂ PGF2 α
RANTES

Trombospondine
TGF β
TNF α
IL-10
IL-6

6.4. RESPIRAÇÃO CELULAR

As mitocôndrias são orgânulos celulares relacionados com a bioenergética e com processos apoptóticos (Mannella, 2006). Além disso, esses orgânulos de dupla membrana são reservatórios de cálcio e participam da geração de espécies reativas do oxigênio. As mitocôndrias são sensíveis às variações da fisiologia celular, e pequenas alterações no pH, osmolaridade e concentração de oxigênio, podem interferir no seu metabolismo. Nos últimos anos, tem sido ressaltado o papel central desempenhado pelas mitocôndrias na etiopatogenia de várias doenças do sistema nervoso. Elas estão envolvidas com lesões isquêmicas, em que ofertas de oxigênio e glicose limitam a sua respiração. Por sua vez, neurônios são lesados muito mais rapidamente que os astrócitos, pela isquemia relativa provocada por vários tipos de agressões. Provavelmente isso acontece porque os astrócitos armazenam glicogênio e este deve ser utilizado para manutenção da sua produção de ATP (Dugan & Kim-Han, 2004).

Brown *et al.* (1995), mostraram que astrócitos reativos apresentam uma inibição reversível da respiração celular, pela produção endógena de NO. Os efeitos tóxicos do

NO podem ser suprimidos pela ativação da cascata de AMPc que inibe a resposta imune (Won *et al.*, 2004).

6.5. SNC E CITOCINAS

Numerosas patologias no SNC estão associadas com o aumento na expressão de citocinas como TNF α , IL-1 β e IL-6, encontradas em doenças neurodegenerativas, infecciosas e em condições outras como traumatismo e isquemia (Klein *et al.*, 2000).

Em condições fisiológicas, os níveis de IL-6 no SNC são baixos. Contudo, durante um processo patológico, esses níveis começam a se elevar. A importância clínica da expressão de IL-6 no SNC lesionado não é completamente compreendida (Van Wagoner & Benveniste, 1999). Sabe-se que IL-6 é uma citocina imunorregulatória, com atividade pró e antiinflamatória e a sua falta, pode interferir na resposta (Figura 4)(Bolin *et al.*, 2005).

As ações da IL-6 no SNC podem ser consideradas benéficas ou destrutivas. Estudos têm demonstrado que a ação dessa citocina promove proliferação de astrócitos e acredita-se que ela esteja envolvida com astrogliose. Em contrapartida, um excesso de sua expressão pode levar a neuropatologias (Van Wagoner & Benveniste, 1999).

O TNF α é um importante mediador da resposta inflamatória em vários tecidos, incluindo o cérebro. Essa citocina pró-inflamatória apresenta diferentes efeitos em astrócitos, tais como proliferação, gliose e indução de outras citocinas, a exemplo da IL-6 (Benveniste *et al.*, 1995; Van Wagoner & Beneviste, 1999). Essa citocina apresenta também a função de regular a resposta imune, modulando a expressão de MHC classe I e II em astrócitos e microglia (Beneviste, 1992).

Sabe-se que a IL-10 inibe a produção de IFN γ (Entrican 2002). Muitas funções das células gliais são reguladas por várias citocinas, sendo a IL-10 descrita como tendo um efeito imunossupressor (Benveniste *et al.*, 1995). Essa citocina inibiu a produção de mediadores da inflamação em células gliais tratadas com LPS (Ledeboer *et al.*, 2000; Ledeboer *et al.*, 2002).

Outras funções da IL-10 envolvem uma retro-regulação da expressão de MHC classe II induzida por IFN γ , a inibição da produção de TNF α e IL-12, assim como a liberação de óxido nítrico (NO), por macrófagos. A IL-10 é produzida no SNC sob diversas condições inflamatórias ou desordens autoimunes, porém, a fonte celular de sua produção intracerebral não foi bem caracterizada "*in vivo*" (Deckert-Schluter *et al* 1997), ainda que tenha sido descrita como sendo produzida por microglia (Ledeboer *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 1994) e por astrócitos no SNC (Sawada *et al.*, 1999).

Assim como as citocinas, o óxido nítrico (NO) é um mensageiro intracelular com muitas funções no SNC (Vincent, 1994; Bredt & Snyder, 1994). Essa espécie reativa do

oxigênio tem ação sobre a destruição de microrganismos, parasitos e células tumorais (Dusse *et al.*, 2003). O NO pode ser produzido frente a uma infinidade de antígenos e com isso, a sua síntese pode ser excessiva, tornando-se neurotóxico (Dawson *et al.*, 1991; Nathan, 1992; Murphy *et al.*, 1993, Lipton *et al.*, 1993; Vincent, 1994). Em astrócitos, a síntese do NO pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1 β e IFN γ (Brown *et al.*, 1995; Won *et al.*, 2004;).

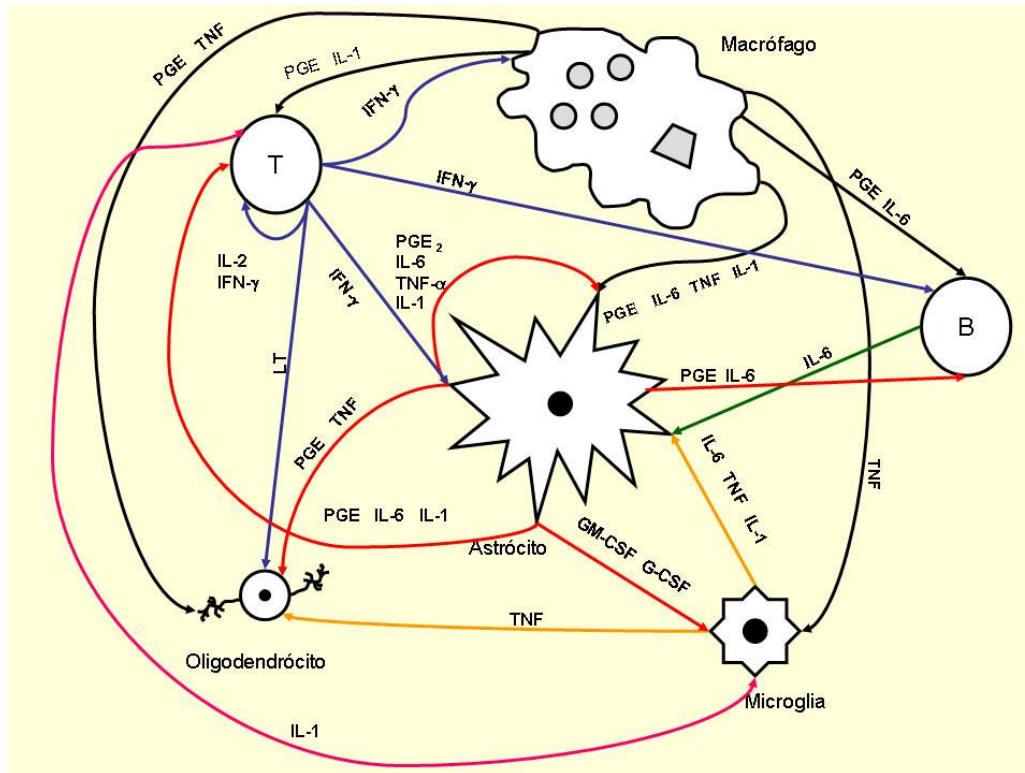


Figura 4 – Interações das células gliais com o sistema imunológico (Adaptado de Tardy *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2000; Bolin *et al.*, 2005).

Culturas de células da glia representam um modelo fiel e prático para estudo das interações fisiopatológicas que envolvem o SNC, uma vez que, conforme explicitado,

essas células desempenham relevantes papéis na manutenção do equilíbrio homeostático e na resposta imune neste tecido (Tardy, 1991). Outrossim, dados da literatura demonstram que a resposta imune frente à neosporose ainda é incipiente, especialmente quanto aos estudos que envolvem o SNC. Assim sendo, esse trabalho buscou elucidar aspectos da imuno-modulação de culturas primárias de astrócitos e de células da microglia, obtidas de cérebros de ratos, infectadas por *N. caninum* com o intuito de melhor compreender aspectos da imuno-patogênese desta parasitose no SNC.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Observar o envolvimento de células do sistema nervoso central na imunopatogênese do *Neospora caninum*.

2. Objetivos específicos

Desenvolver um modelo de estudo da infecção de cultura de células gliais de rato pelo *N. caninum*.

Avaliar as alterações celulares (proliferação, diferenciação e morte celular) frente à infecção com o *N. caninum* e correlaciona-las com aspectos patogênicos da neosporose.

Observar o perfil de citocinas e de marcadores gliais em culturas primárias do SNC de ratos infectadas com o *N. caninum*.

III. RESULTADOS

ARTIGO I - Astroglial cells in primary culture: A valid model to study *Neospora caninum* infection in the CNS - Veterinary Immunology and Immunopathology 113 (2006) 243-247

ARTIGO II – *Neospora caninum*: Infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro – Experimental Parasitology 112 (2006) 193-197.

Formatado: Inglês (EUA)

ARTIGO III – Host / parasite relationship in the in vitro infection of rat gliocytes by *Neospora caninum*: Evaluation of cell respiration – Aceito para publicação in Research in Veterinary Science RVSC – 06-425R1

ARTIGO IV – Evaluation of IL-6, TNF α and IL-10 in mixed glial cultures infected in vitro by the *Neospora caninum* – a ser submetido a Veterinary Parasitology

IV. DISCUSSÃO

Os modelos de cultura utilizados mostram-se adequados para o estudo das interações imunológicas do *N. caninum* no SNC, uma vez que o parasito, apresentando tropismo por este tecido, se desenvolve nessas células. As culturas gliais respondem à infecção modificando sua morfologia, caracterizada por aumento do corpo celular e reorganização dos filamentos intermediários, além da produção de citocinas de perfil Th1 e Th2.

A resposta imunológica a esta parasitose foi descrita por vários autores (Khan 1997, Kasper & Khan 1998; Tanaka *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2000). Esses pesquisadores encontraram um padrão Th1, com produção de IFN- γ e de IL-12, perfil esse esperado, uma vez que *N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório e seu hospedeiro tentará combater a infecção com citocinas que promovem, dentre outras ações, uma maior proliferação celular.

Nossos resultados mostram que nas culturas de células da glia infectadas com *N. caninum*, existem elevadas concentrações de citocinas do perfil Th2. Esses achados podem indicar um outro padrão de resposta das células do SNC frente à infecção deste parasito, como aquele observado na gestação, quando foram descritos elevados valores de IL-10 na barreira materno-fetal (Innes *et al.*, 2002; Almeria *et al.*, 2003).

Ao estudar animais infetados com o *N. caninum*, Bartley et al (2004) observaram que linfonodos retrofaringeanos de animais que apresentavam sintomatologia nervosa, ao receberem a drenagem linfática do SNC, apresentavam células com fenótipo T CD4⁺. Sabendo que estas células podem apresentar uma derivação tanto Th1 como Th2, esses achados, eventualmente, poderiam corroborar com o padrão de citocinas encontrados em nossas culturas.

A ocorrência da neosporose durante a prenhez acarreta reações diversas, conforme o tempo de gestação, a exposição ao parasito, assim como, um contato prévio com o agente, podendo ocorrer desde abortamentos, no terço inicial, até nascimentos de

bezerros assintomáticos (Innes et al., 2002; Quinn et al 2002; Andrianarivo et al., 2005; Innes et al., 2005). Os índices de IFN- γ produzidos pela mãe são determinantes na resposta ao parasito e, no curso da gestação, estes podem ser modulados pelo IL-10 e outras citocinas antiinflamatórias do feto (Williams et al 2000; Innes et al 2002).

Estudos “in vitro” têm demonstrado um aumento da expressão de IL-10 no SNC de animais infectados com *T. gondii* (Burke et al., 1994; Schluter et al., 1997). Segundo Gazzinelli et al. (1992) essa citocina contribui para a diminuição do dano tecidual, entretanto, favorece a persistência do parasito. Em contrapartida, camundongos *knockout* para IL-10, quando infectados com *T. gondii*, mostraram uma alta suscetibilidade aos efeitos inflamatórios provocados por IL-12 e IFN- γ , e não apresentaram uma proliferação excessiva do parasito (Gazzinelli et al., 1996; Willi et al., 2001). Nesse contexto, Rozenfeld et al. (2003), sugerem que na toxoplasmose a IL-10 apresenta um papel importante na homeostase do SNC, eliminando os danos teciduais.

Em nosso estudo, uma super produção de IL-10 pelos astrócitos é provavelmente responsável pelos valores basais de IFN- γ . Isto favoreceria um ambiente imunológico privilegiado para que o cérebro venha a desempenhar suas funções vitais, num mecanismo semelhante àquele verificado quando uma gestação, estado igualmente singular, cursa com a neosporose.

A IL-6, citocina do perfil Th2, provavelmente apresenta uma ação protetora. Essa citocina imunorregulatória com atividades pró e antiinflamatórias, além de promover a proliferação de astrócitos, está relacionada com a astrogliose (Van Wagoner & Benveniste, 1999; Bolin et al., 2005).

Apesar de terem sido encontradas altas concentrações de IL-10 e IL-6, valores de TNF- α e NO também foram encontrados. As presenças dessa última citocina e dessa espécie reativa do oxigênio, demonstram que, apesar de existir uma forte tendência para um perfil de citocinas Th2, a resposta inflamatória não desaparece por completo.

Halonen *et al.* (1998) consideram que o NO não é importante na destruição de *T. gondii* em culturas de astrócitos e Wilson & Hunter (2004) acreditam que astrócitos têm uma outra forma de destruição deste parasito, que não a utilização de NO. Da mesma forma, TNF- α sozinho não foi capaz de inibir o crescimento de *T. gondii* em culturas primárias de astrócitos murinos (Halonen *et al.*, 1998). Em contrapartida, Yamane *et al.* (2000), relatam a importância do TNF- α e do NO no controle do *N. caninum* no SNC, observando redução significativa de sua proliferação em culturas do SNC contendo principalmente neurônios.

O TNF- α apresenta grande importância na resposta inflamatória de vários tecidos e, no SNC, promove proliferação de astrócitos e gliose. O NO é um agente responsável pela destruição de microorganismos, parasitos e células tumorais (Benveniste et al., 1995; Van-Wagones & Benveniste 1999; Dusse et al., 2003). Isso mostra que, mesmo com a

IL-10 inibindo a ação do IFN- γ , existe produção de outras citocinas, a exemplo de IL-6 e TNF- α , além de NO, que vão promover uma resposta frente ao *N. caninum*.

A gliose e a astrogliose observadas nos experimentos, provavelmente são resultados das ações do TNF- α e da IL-6. Culturas puras de astrócitos apresentaram um aumento no corpo astrocitário e uma maior reatividade, quando marcadas com anticorpos anti GFAP, enquanto que, culturas de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) apresentaram uma maior quantidade de prolongamentos, evidenciando uma reorganização dos filamentos intermediários e áreas com grande concentração de células microglias. Essa observação demonstra a importância da interação astrócito X microglia para a resposta contra a infecção (Vilhardt, 2005).

No *Western immunoblotting*, houve aumento da reatividade de glutamida sintetase, que apresenta um papel fundamental no metabolismo intermediário, no desenvolvimento, na regulação de neurotransmissores e na detoxicação de aminoácidos junto às células gliais. A expressão de OX-42 apresentou-se aumentada com 24h de infecção. Alterações na expressão dessa proteína são relacionadas com ativação microglial, seja pela sua expressão na microglia ativada, ou pela proliferação dessas células, indicando microgliose. Essas células têm papel fundamental na resposta do SNC na toxoplasmose (Wilson & Hunter, 2004). Não foi observado, contudo, aumento da expressão do GFAP nem de vimentina. A imunocitoquímica para o GFAP, revelou uma modificação fenotípica das células infectadas. O aumento na expressão de GFAP tem

sido observado em períodos mais prolongados, em torno de 7 a 8 dias de tratamento (Chiu & Goldman, 1984; Morrison *et al.*, 1985).

O consumo de oxigênio de células da glia infectadas com *N. caninum* não apresentou diferença significativa, quando comparado com o controle. A preservação da atividade mitocondrial demonstra a habilidade deste parasito em conviver com seu hospedeiro, sem alterar uma das mais importantes fontes de energia para a manutenção da vida de ambos. Deste modo, o parasito pode usufruir ao máximo das células hospedeiras, para sua própria multiplicação e manutenção.

V. CONCLUSÕES

O modelo experimental "*in vitro*", demonstrou ser eficiente para o estudo das relações existente entre o *Neospora caninum* e as células da glia de rato.

Os astrócitos de rato "*in vitro*" respondem à infecção pelo *Neospora caninum* com uma hipertrofia e alteração dos filamentos intermediários.

IL-10, IL-6 e TNF- α são produzidas por células gliais de rato, infectadas, "*in vitro*" com o *N. caninum*

IFN γ não foi detectado no sobrenadante de culturas de células gliais e astrocíticas de rato infectadas "*in vitro*" com *N. caninum*..

NO foi detectado no sobrenadante de culturas de células da glia de rato, infectadas "*in vitro*" com o *N. caninum*.

Gliócitos de ratos infectados com o *N. caninum* "*in vitro*", não apresentam alteração do metabolismo mitocondrial, nas condições estudadas.

O conjunto dos resultados sugere uma resposta do tipo Th2 em culturas de células gliais infectadas "*in vitro*" com o *Neospora caninum*.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeria, S., De Marez, T., Dawson, H., Araujo, R., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25, 383-392, 2003.

Aloisi, F., Borsellino, G., Samoggia, P., Testa, U., Chelucci, C., Russo, G., Peschle, C., Levi, G., Astrocyte cultures from human embryonic brain: Characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines. *J Neurosci Research* 32, 494-506, 1992.

Aloisi, F. Immune function of microglia. *Glia* 36, 165–179, 2001.

Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L., Conrad, P.A., *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 198, 241-244, 1991.

Anderson, M.L., Barr, B.C., Conrad, P.A., Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 10, 439-461, 1994.

Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci.* 60-61, 417-431, 2000.

Andrianarivo, A.G., Anderson, M.L., Rowe, J.D., Gardner, I.A., Reynolds, J.P., Choromanski, L., Conrad, P.A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally

infected with *Neospora caninum* with and without immunization. Parasitol Res. 96, 24-31, 2005.

Barber, J.S., Payne-Johnson, C.E., Trees, A.J. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. J Small Anim Pract. 37, 568-574, 1996.

Barber J.S., Gasser R.B., Ellis J., Reichel M.P., McMillan D., Trees A.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. J Parasitol. 83, 1056-1058, 1997.

Barber J.S., Trees A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. Int J Parasitol. 28, 57-64, 1998.

Barr, B.C., Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Daft, B.M., Kinde, H., Conrad, P.A. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. Vet Pathol 27, 354-361, 1990.

Barr, B.C., Anderson, M.L., Dubey, J.P., Conrad, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet Pat 28, 110-116, 1991.

Barr, B.C., Anderson, M.L., Woods, L.W., Dubey, J.P., Conrad, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. J Vet Diagn Invest. 4, 365-367, 1992.

Barr, B.C., Conrad, P.A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M.L., Reynolds, J., Chauvet, A.E., Dubey, J.P., Ardans, A.A. Congenital *Neospora* infection in calves from cows that had previously aborted Med Assoc 202, 113-117, 1993.

Barres, B.A., Barde, Y.A. Neuronal and glial cell biology. Current Opinion in Neurobiol 10, 642-648, 2000.

Bartley, P.M., Kirvar, E., Wright, S., Swales, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Maley, S.W., Schock, A., Rae, A.G., Hamilton, C., Innes, E.A. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. J Comp Pathol. 130, 81-91, 2004.

Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Hill, D.E., Kwok, O.C., Shen, S.K., Dubey, J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol. 87, 612-618, 2001.

Baszler, T.V., Long, M.T., McElwain, T.F., Mathison, B.A. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. Int J Parasitol. 29, 1635-1646, 1999.

Beneviste, E.N. Cytokines: Influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol* 52, 106-153, 1992.

Benveniste, E.N., Tang, L.P., Law, R.M. Differential regulation of astrocyte TNF- α expression by the cytokines TNF- β , IL-6 and IL-10. *Int J Devl Neurosci* 13, 341-349, 1995.

Bergeron, N., Girard, C., Pare, J., Fecteau, G., Robinson, J., Baillargeon, P. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J Vet Diagn Invest.* 13, 173-175, 2001.

Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., Uyeda, C.T. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43, 429-435, 1972.

Bjerkas, I., Monh, S.F., Presthus, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd* 70, 271-274, 1984.

Bjorkman, C., Lunden, A., Holmdahl, J., Barber, J., Trees, A.J., Ugglå, A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol.* 16, 643-648, 1994.

Bjorkman, C., Johansson, O., Stenlund, S., Holmdahl, O.J., Uggla, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. J Am Vet Med Assoc. 208, 1441-1444, 1996.

Bjorkman, C., Uggla, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol. 29, 1497-1507, 1999.

Bjorkman, C., Naslund, K., Stenlund, S., Maley, S.W., Buxton, D., Uggla, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J Vet Diagn Invest. 11, 41-44, 1999.

Bjorkman, C., Gondim, L.F., Naslund, K., Trees, A.J., McAllister, M.M. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. Vet Parasitol. 128, 195-200, 2005.

Bolin, L.M., Zhaung, A., Strychkarska-Orczyk, I., Nelson, E., Huang, I., Malit, M., Nguyen, Q. Differential inflammatory activation of IL-6 (-/-) astrocytes. Cytokine 30, 47-50, 2005.

Baumann, N., Phan-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian Central Nervous system. Physiol Review 81, 871-910, 2001.

Bredt, D.S., Snyder, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu Rev Biochem 63, 175-195, 1994.

Brown, G.C., Bolaños, J.P., Simon, J.R., Heales, S.J.R., Clark, J.B. Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. *Neurosci Letters* 193, 201-204, 1995.

Butt, A.M., Ransom, B.R. Morphology of astrocytes and oligodendrocytes during development in the intact rat optic nerve. *J Comp Neurol* 338,141-158, 1993.

Buxton, D., Maley, S.W., Wright, S., Thomson, K.M., Rae, A.G., Innes, E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol.* 118, 267-279, 1998.

Buxton, D., McAllister, M.M., Dubey, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitol.*, 18, 546-552, 2002.

Chaouat, G., Assal Meliani, A., Martal, J., Raghupathy, R., Elliott, J.F., Mosmann, T., Wegmann, T.G. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol.* 154, 4261-4268, 1995.

Chiu, F.C., Goldman, J.E. Synthesis and turnover of cytoskeletal proteins in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 42, 166-174, 1984.

Conrad, P.A., Barr, B.C., Sverlow, K.W., Anderson, M.L., Daft, B., Kinde, H, Dubey, J.P., Munson, L., Ardans, A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. From aborted bovine fetuses. *Parasitol* 106, 239-249, 1993.

Corbellini, L.G., Colodel, E.M., Driemeier, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J Vet Diagn Invest.* 13, 416-419, 2001.

Corebellini, L.G., Driemeier, D., Cruz, C.F.E., Gondim, L.F.P., Wald, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet Parasitol* 103, 195-202, 2002.

Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S., Snyder, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6368-6371, 1991.

Deckert-Schluter, M, Buck, C., Weiner, D., Kaefer, N., Rang, A., Hof, H., Wiestler, O.D., Schluter, D. Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in the chronic *Toxoplasma* encephalitis. *J Neuroimmunol* 76, 167-176, 1997.

Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Wouda, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int J Parasitol.* 31, 209-215, 2001.

Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F.J., Wouda, W., Barkema, H.W. 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, 2001.

Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. Journal of American Veterinary Medical Association 192, 1269-1285, 1988a.

Dubey, J.P., Hattel, L., Lindsay, D.S., Topper, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. Journal of the Am Vet Med Assoc 193, 1259-1263, 1988b.

Dubey J.P., Lindsay D.S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. Am J Vet Res. 50, 1578-1579, 1989.

Dubey, J.P., Hartley, W.J., Lindsay, D.S., Topper, M.J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. J Parasitol. 76, 127-130, 1990.

Dubey, J.P., Porterfield, M.L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. J Parasitol. 76, 732-734, 1990.

Dubey, J.P., Koestner, A., Piper, R.C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. J Am Vet Med Assoc 197, 857-860, 1990.

Dubey, J.P., De Lahunta, A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. Appl. Parasitol. 34, 532-534, 1993.

Dubey, J.P., Metzger, F.L., Halttel, A.L., Lindsay, D.S., Fritz, D.L. Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with clindamycin. Vet. Dermatol 6, 37-44, 1995.

Dubey, J.P., Lindsay, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet. Parast. 67, 1-59, 1996.

Dubey, J.P., Rigoulet, J., Lagourette, P., George, C., Longeart, L., LeNet, J.L. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). J Parasitol. 82, 338-339, 1996.

Dubey, J.P., Dorough, K.R., Jenkins, M.C., Liddell, S., Speer, C.A., Kwok, O.C., Shen, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. Int J Parasitol. 28, 1293-1304, 1998.

Dubey, JP. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. J Am Vet Med Assoc. 214, 1160-1163, 1999.

Dubey, J.P. Recent advances in *Neospora* and Neosporosis. *Vet Parasitol* 84, 349-367, 1999.

Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkas, I., Bjorkman, 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., Lindsay, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* 32, 929–946, 2002.

Dubey, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41, 1–16, 2003.

Dugan, L.L., Kim-Ham, J.S. Astrocyte mitochondria in In vitro models of ischemia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36, 317-321, 2004.

Dusse, L. M. S'A., Vieira, L. M., Carvalho, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Méd Lab* 39, 343-350, 2003.

Eddleston, M., Mucke, L. Molecular profile of reactive astrocytes implications for their role in neurologic disease. *Neurosci* 54, 15-36, 1993.

Eliasson, C., Sahlgren, C., Berthold, C.H., Stakeberg, J., Celis, J.E., Betsholtz, C., Eriksson, J.E., Pekny, M. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* 274, 23996-24006, 1999

Eng L.F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 8, 203-214, 1985

Entrican G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J Comp Pathol.* 126, 79-94, 2002.

Eperon, S., Bronnimann, K., Hemphill, A., Gottstein, B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 21, 225-36, 1999

Fischer, H.C., Reichmann, G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol* 166, 2717-2726, 2001.

Gee, J., Keller, J. N. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37, 1145-1150, 2005.

Gimsa, U.O., Ren, A., Pandiyan, P., Teichmann, D., Bechmann, I., Nitsch, R., Brunner-Weinzierl, M.C. Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J Mol Med.* 82, 364-72, 2004.

Gondim, L.F.P., Sartor, I.F., Monteiro Jr, L.A., Haritani, M. *Neospora caninum* infection in a aborted bovine foetus in Brazil. *New Zealand Vet J* 47, 35, 1999.

Gondim, L.F., Pinheiro, A.M., Santos, P.O., Jesus, E.E., Ribeiro, M. B., Fernandes, H.S., Almeida, M.A., Freire, S.M., Meyer, R., McAllister, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Veterinary Parasitology*, 101, 1-7, 2001.

Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are the definitive host of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 34, 159-161, 2004.

Haldorson, G.J., Mathison, B.A., Wenberg, K., Conrad, P.A., Dubey, J.P., Trees, A.J., Yamane, I., Baszler, T.V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int J Parasitol*. 35, 1407-15, 2005.

Hansson, E., 1982, Primare astroglial cultures: Aspects of morfology, biochemistry and transmitter metabolism. *Goteborg* 1-61.

Hay, W.H., Shell, L.G., Lindsay, D.S., Dubey, J.P. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 197, 87-89, 1990.

Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Hehl, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 29, 1175-1188, 1999.

Hemphill, A., Gottstein, B., Conraths, F.J., De Meerschman, F., Ellis, J.T., Innes, E.A., McAlliser, M.M., Ortega-Moura, L.M., Tenter, A.J., Trees, A.J., Uggla, A., Williams, D.J.L., Wouda, W. A European perspective on *Neospora caninum*. Int J Parasitol 30, 877-924, 2000.

Hilali, M., Lindberg, R., Waller, T., Wallin, B. Enigmatic cyst-forming sporozoon in the spinal cord of a dog. Acta Vet Scand 27, 623-625, 1986.

Ho, M.S., Barr, B.C., Marsh, A.E., Anderson, M.L., Rowe, J.D., Tarantal, A.F., Hendrickx, A.G., Sverlow, K., Dubey, J.P., Conrad, P.A. Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. J Clin Microbiol. 34, 1203-1208, 1996.

Hoskins, J.D., Bunge, M.M., Dubey, J.P., Duncan, D.E. Disseminated infection with *Neospora caninum* in a ten-year-old dog. Cornell Vet. 81, 329-334, 1991.

Innes, E.A., Panton, W.R., Marks, J., Trees, A.J., Holmdahl, J., Buxton, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. J Comp Pathol. 113, 95-100, 1995.

Innes, E.A., Buxton, D., Maley, S., Wright, S., Marks, J., Esteban, I., Rae, A., Schock, A., Wastling, J. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. Ann N Y Acad Sci. 916, 93-101, 2000.

Innes, E.A., Andrianarivo, A.G., Bjorkman, C., Williams, D.J., Conrad, P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends Parasitol. 18, 497-504, 2002.

Innes, E.A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C. Esteban-Redondo, I., Buxton, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. Vet Immunol Immunopathol. 108, 29-36, 2005.

Jackson, W., De Lahunta, A., Adaska, J., Cooper, B., Dubey, J.P. *Neospora caninum* in a adult dog with progressive cerebellar sings. Prog Vet Neurol 6, 124-127, 1995.

Jenkins, M.C., Fetterer, R., Schares, G., Bjorkman, C., Wapenaar, W., McAllister, M., Dubey, J.P. HPLC purification of recombinant NcGRA6 antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis. Vet Parasitol. 131, 227-234, 2005.

Juurlink, H. J., Hertz, L., Neuromethods, Pratical cell culture techniques., A. Boulton, G. Baker and W. Walz. The Humana press Inc. 23 Ed., 1992

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. Nerve cells and behavior. In: Principles of neuronal science, 4 ed, New York:Mcgraw Hill, p5-35, 2000.

Kasper, L.H., Khan, I.A. Antigen-specific CD8⁺ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. Infect. Immunol 66, 1554-1560, 1998.

Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Fonseka, S., Kasper, L.H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. Exp Parasitol. 85, 24-34, 1997.

Kimelberg, H. K. The problem of astrocyte identity. Neurochem Int 45, 191-202, 2004.

Klein, B.D., Steve, W., Callahan, K.S. Cytokine and intracellular signaling regulation of tissue factor expression in astrocytes. Neurochem Int 36, 441-449, 2000.

Kobayashi, Y., Yamada, M., Omata, Y., Koyama, T., Saito, A., Matsuda, T., Okuyama, K., Fujimoto, S., Furuoka, H., Matsui, T. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. J Parasitol. 87, 434-436, 2001.

Kriegstein, A., Gotz, M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. Glia 43, 37-43, 2003.

Lally, N.C., Jenkins, M.C., Dubey, J.P. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. Clin Diagn Lab Immunol 3, 275-279, 1996.

Ledeboer, A., Brevé, J.J.P., Poole, S., Tilders, F.J.H., Vam Dam, A.M. Interleukin-10, Interleukin-4 and transforming growth factor- β differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. Glia 30, 134-142, 2000.

Ledeboer, A., Brevé, J.J.P., Wierinckx, A., Jagt, S.V.D., Bristow, A.F., Leysen, J.E., Tilders, F.J.H., Vam Dam, A.M. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. European J Neuroscience 16, 1175-1185, 2002.

Lent, R. Cem bilhoes de neuronios: Conceitos fundamentais de neurociências. SP: Atheneu, 66-95, 2001.

Letournel-Boulland, M.L., Fages, C., Rolland, B., Tardy, M. Lipopolysaccharides (LPS) up regulate the IL-1-mRNA and downregulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS)-mRNAs in astroglial primary culture. Euro Cytokine Network 5, 51-56, 1994.

Lindsay, D.S., Dubey, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am. J. Vet Res 50, 1981-1983, 1989.

Lindsay, D.S., Kelly, E.J., McKown, R.D., Stein, F.J., Plozer, J., Herman, J., Blagburn, B.L., Dubey, J.P. 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, 1996.

Lindsay, D.S., Upton, S.J., Dubey, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. Int J Parasitol. 29, 1521-1523, 1999.

Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., Stamler, J.S. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature 364, 626-632, 1993.

Lobato, J., Silva, D.A., Mineo, T.W., Amaral, J.D., Segundo, G.R., Costa-Cruz, J.M., Ferreira, M.S., Borges, A.S., Mineo, J.R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. Clin Vaccine Immunol. 13, 84-89, 2006.

Long, M.T., Baszler, T.V., Mathison, B.A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. J Parasitol. 84, 316-320, 1998.

Long, M.T., Baszler, T.V. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. J Immunol 164, 4768-4774, 2000.

Mannella, C.A. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. Biochimica et Biophysica Acta. 1762, 140-147, 2006.

Marsh, A.E., Barr, B.C., Packham, A.E., Conrad, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). The J Parasitol 84, 983-991, 1998.

McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M. Dogs are the definitive host of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology 28, 1473-1478, 1998.

McAllister, M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. Parasitol Today 15, 216-217, 1999.

Mineo, T.W., Silva, D.A., Costa, G.H., von Ancken, A.C., Kasper, L.H., Souza, M.A., Cabral, D.D., Costa, A.J., Mineo, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum*

and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. Vet Parasitol. 98, 239-245, 2001.

Mizuno, T., Sawada, M. Marunouchi, T., Suzumura, A. Production of IL-10 by mouse glial cells in culture. Biochem Biophys Res Commun 205, 1907-1915, 1994.

Moore, D.P., Leunda, M.R., Zamorano, .Pl., Odeon, A.C., Romera, S.A., Cano, A., de Yaniz, G., Venturini, M.C., Campero, C.M. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. Vet Parasitol. 130, 29-39, 2005.

Morrison, R.S., De Vellis, J., Lee, Y.L., Bradshaw, R.A., Eng, L.F. Hormones and growth factors induce the synthesis of glial fibrillary acidic protein in rat brain astrocytes. J Neurosci Res. 14, 167-176, 1985.

Murphy, S., Simmons, M.L., Agulló, L., Garcia, A., Feinstein, D.L., Galea, E., Reis, D.J., Minc-Golomb, D., Schwartz, J.P. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. Trends Neurosci 16, 323-328, 1993.

Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 6, 3051-3064, 1992.

Nishikawa, Y., Inoue, N., Makala, L., Nagasawa, H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. *Vet Parasitol.* 116, 175-184, 2003.

Norenberg, M.D. Astrocyte responses to CNS injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 213-220, 1994.

Odin, M., Dubey, J.P. Sudden death associated with *Neospora caninum* myocarditis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 203, 831-833, 1993.

Omata, Y., Kano, R., Masukata, Y., Kobayashi, Y., Igarashi, M., Maeda, R., Saito, A. Development of *Neospora caninum* cultured with human serum in vitro and in vivo. *J Parasitol* 91, 222-225, 2005.

O'toole, D., Jeffrey, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet Rec* 121, 563-566, 1987.

Otero, G.C., Merrill, J.E. Cytokine receptors on glial cells. *Glia* 11, 117-128, 1994.

Pare, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 7, 352-9, 1995.

Pare, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res.* 60, 133-139, 1996.

Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., Loomis, E.F., Rowe, J.D., Anderson, M.L., Marsh, A.E., Cray, C., Bar, r B.C. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5, 467-473, 1998.

Parish, S.M., Maag-Miller, L., Besser, T.E., Weidner, J.P., McElwain, T., Knowles, D.P., Leathers, C.W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J Am Vet Med Assoc* 191, 1599-1600, 1987.

Peters, M., Wagner, F., Schares, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitol Res.* 86, 1-7, 2000.

Peters, M., Lutkefels, E., Heckerroth, A.R., Schares, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol* 31, 1144-1148, 2001.

Pham-Dinh, D. Physiologi du Neurone: Les celules gliales. *Dolin* 35-74, 1999.

Pinheiro, A.M., Costa, M.F., Paule, B., Vale, V., Ribeiro, M., Nascimento, I., Schaer, R.E., Almeida, M.A., Meyer, R, Freire, S.M. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Vet Parasitol.* 130, 73-9, 2005.

Polazzi, E., Contestabile, A. Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 13, 221-242, 2002.

Privat, A., Gimenez-Ribotta, M., Ridet, J-C. Morphology of astrocytes. In: Neuroglia (Ransom BR, Kettenmann H, eds). New York: Oxford University Press:3-22, 1995.

Quinn, H.E., Ellis, J.T., Smith, N.C. *Neospora caninum*: another protozoan that causes of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol* 18, 391-394, 2002.

Quinn, H.E., Miller, C.M., Ellis, J.T. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *Int J Parasitol* 34, 723-732, 2004.

Ritter, D.M., Kerlin, R., Sibert, G., Brake, D. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *J Parasitol.* 88, 271-80, 2002.

Rock, R. B.; Gekker, G.; Hu, S.; Sheng, W. S.; Cheeran, M.; Lokensgard, J. R.; Peterson P. K. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clin. Microb. Rev* 17, 942–964, 2004,

Rodrigues, A.A., Gennari, S.M., Paula, V.S., Aguiar, D.M., Fujii, T.U., Starke-Buzeti, W., Machado, R.Z., Dubey, J.P. Serological responses to *Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet Parasitol.* 129, 21-24, 2005.

Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J.P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res.* 84, 50-3, 1998.

Romero, J.J., Perez, E., Frankena, K., Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.* 123, 149-159, 2004.

Santambrogio, L., Belyanskaya, S.L., Fischer, F.R., Cipriani, B., Brosnan, C.F., Ricciardi-Castagnoli, P. Development plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98, 6295-6300, 2001.

Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., Nagatsu, T. Interleukin 10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J Neurochem* 72, 1666-1471, 1999.

Selmaj, K.W., Faroog, M., Norton, W.T., Raine, C.S., Brosnan, C.F. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor, *J Immunol* 144, 129-135, 1990.

Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Barwald, A., Conraths, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol.* 80, 87-98, 1998.

Schares, G., Rauser, M., Sondgen, P., Rehberg, P., Barwald, A., Dubey, J.P., Edelhofer, R., Conraths, F.J. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 30, 1123-1130, 2000.

Schares, G., Wenzel, U., Muller, T., Conraths, F.J. Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Parasitol.* 31, 418-423, 2001.

Shivaprasad, H. L., Ely, R., Dubey, J.P. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet Parasitol* 34, 145-148, 1989.

Speer, C.A., Dubey, J.P., McAllister, M.M., Blixt, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 29, 1509-1519, 1999.

Spencer, J.A., Higginbotham, M.J., Young-White, R.R., Guarino, A.J., Blagburn, B.L. *Neospora caninum*: adoptive transfer of immune lymphocytes precipitates disease in BALB/c mice. *Vet Immunol Immunopathol.* 106, 329-333, 2005,.

Staska, L.M., McGuire, T.C., Davies, C.J., Lewin, H.A., Baszler, T.V. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes *Infect Immun.* 71, 3272-3279, 2003.

Streit, W.G. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133-139, 2002.

Streit, W.J., Walter, S.A., Pennell, N.A. Reactive microgliosis. *Progress Neurobiol* 57, 563-581, 1999.

Tanaka, T., Hamada, T., Inoue, N., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Vet Parasitol* 90, 183-191, 2000.

Tardy, M. Astrocyte et homéostasie. *Médecine/Sciences*, 7, 799-804, 1991.

Tardy, M., Martel, M., Guillemin, G., Owe-Young, R. Intercrions entre les cellules microgliales et les autre cellules du SNC. In: *Neuroanatomie fonctionelle de la cellules aux comportements - celules microgliales*, ANPP 7 ed. , 2001.

Teixeira, L., Marques, A., Meireles, C.S., Seabra, A.R., Rodrigues, D., Madureira, P., Faustino, A.M., Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, P., Correia da Costa, J.M., Canada, N., Vilanova, M. Characterization of the B-cell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. *Immunology.* 116, 38-52, 2005.

Thilsted, J.P., Dubey J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J. Vet Diagn Invest 1, 205-209, 1989.

Tranas, J., Heinzen, R.A., Weiss, L.M., McAllister, M.M. Serological evidences of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. Clin Diag Lab Immunol 6, 765-767, 1999.

Van Wagoner, N.J., Benveniste, E.N. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. J Neuroimmunol 100, 124-139, 1999.

Vilhardt, F. Microglia: phagocyte and glia cell. The Int J Biochem & Cell Biology 37, 17-21, 2005.

Vincent, S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. Prog Neurobiol 42, 129-160, 1994.

Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today. 14, 353-356, 1993.

Williams, D.J., McGarry, J., Guy, F., Barber, J., Trees, A.J. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. Vet Rec. 140, 328-331, 1997.

Williams, D.J., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., MacEachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*. 121, 347-358, 2000.

Won, J.S., Im, Y.B, Singh, A.K., Singh, I. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radic Biol Med* 37, 1834-1844, 2004.

Woods, L.W., Anderson, M.L., Swift, P.K., Sverlow, K.W. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *J Vet Diagn Invest*. 6, 508-510, 1994.

Wouda, W., Moen, A.R., Visser, I.J.R., Van Knapen, F. Bovine fetal neosporosis: A comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistological identification of organisms in brain, heart and liver. *J Vet Diagn Invest* 9, 180-185, 1997.

Wren, G. Abortion in cattle: BVDV and *Neospora*. *Bov vet Shawnee Mission* 12-17, 1999.

Yamane, I., Kokuho, T., Shimura, K., Eto, M., Shibahara, T., Haritani, M., Ouchi, Y., Sverlow, K., Conrad, P.A. In vitro isolation and characterisation of a bovine *Neospora* species in Japan. Res Vet Sci. 63, 77-80, 1997.

Yamane, I., Kitani, H., Kokuho, T., Shibahara, T., Haritani, M., Hamaoka, T., Shimizu, S., Koiwai, M., Shimura, K., Yokomizo, Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. J Vet Med Sci. 62, 347-351, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)