



**RAFAEL CARNEIRO COSTA**

**Caracterização de eventos imunopatológicos no sistema nervoso central de caprinos naturalmente infectados por *Neospora caninum*.**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**RAFAEL CARNEIRO COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO DE EVENTOS IMUNOPATOLÓGICOS EM  
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAPRINOS NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Neospora caninum*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Mary Suzan Varaschin

**LAVRAS-MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Costa, Rafael Carneiro.

Caracterização de eventos imunopatológicos no sistema nervoso central de caprinos naturalmente infectados por *Neospora caninum* / Rafael Carneiro Costa. – Lavras : UFLA, 2014.

57 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Mary Suzan Varaschin.

Bibliografia.

1. Aborto. 2. Caprinos machos. 3. Encefalite. 4. Gliose. 5. Neosporose. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.089696

**RAFAEL CARNEIRO COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO DE EVENTOS IMUNOPATOLÓGICOS EM  
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAPRINOS NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *NEOSPORA CANINUM*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dra. Angélica Teresinha Barth Wouters	UNIFENAS
Dr. Djeison Lutier Raymundo	UFLA

Dra. Mary Suzan Varaschin  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2014**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, minha mãe, Ana Cláudia, minha irmã Mariana e meu irmão Pedro por todo o apoio nesta jornada.

Aos meus amigos de mestrado, Débora, Leonardo e Priscila por toda a ajuda, conversas e risadas.

À minha orientadora, Mary, por confiar a mim este trabalho e pelos ensinamentos desde a graduação.

À minha coorientadora, Ana Paula, por estar sempre disponível a me ajudar.

Aos meus professores de patologia Fladimir, Pedro, Josi e Djeison por me ensinarem cada vez mais.

Aos estagiários, mestrandos e doutorandos do laboratório pelo auxílio nas atividades realizadas sempre que precisava.

Aos funcionários do laboratório Welson e Rodrigues por manterem tudo sempre limpo e funcionando.

## RESUMO

Neste estudo foram avaliadas as lesões microscópicas e a resposta imunológica celular no sistema nervoso central (SNC) de dez fetos caprinos provenientes de abortos e de sete caprinos machos, jovens e adultos. Para este propósito, foi realizada a marcação imuno-histoquímica, com os anticorpos anti CD3, CD79 $\alpha$ , GFAP, MHC-II, Lectinoistoquímica RCA1, além do marcador de antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA). As lesões encontradas nos fetos consistiram de áreas de necrose multifocais, circundadas por células da glia e de manguitos perivasculares, que se concentravam, principalmente, em regiões de córtex cerebral, tálamo e tronco encefálico. Estas lesões estavam ou não relacionadas à presença de estruturas parasitárias. No sistema nervoso central dos caprinos jovens e adultos, foram encontradas lesões semelhantes em quatro dos seis caprinos positivos para *N. caninum* e, em dois destes, as lesões eram acentuadas, apesar destes animais não manifestarem sinais clínicos. Em três caprinos adultos, ainda, foram encontradas poucas células gigantes, relacionadas às lesões. A presença do parasito foi avaliada, por meio de análise de histopatologia, imuno-histoquímica e pela reação em cadeia da polimerase (PCR), evidenciando a infecção em sete dos 10 fetos e em seis dos sete caprinos adultos. A marcação imuno-histoquímica das células presentes, nas áreas de gliose, permitiram caracterizá-las como microgliose e astrogliose e afirmar que na infecção por *Neospora caninum*, em caprinos, fetos e adultos, há uma polarização para a resposta de células de linhagem monocítica (macrófagos e micróglia), com menor participação de astrócitos. Nos fetos, os astrócitos estavam presentes em lesões próximas à substância branca e, nos adultos, a astrogliose estava presente na substância cinzenta de três caprinos representando cicatrizes gliais. Também ocorreu a expressão de moléculas de MHC-II em endotélio e micróglia, principalmente, nos caprinos adultos, provavelmente, estimulada pela presença do parasito no tecido. Neste estudo é descrita a presença de cistos de *N. caninum* em SNC de caprinos machos adultos, o que não foi demonstrado, até o presente momento, em animais adultos de qualquer espécie e são caracterizados os tipos celulares envolvidos na resposta imunológica no SNC.

Palavras chave: Aborto. Encefalite. Gliose. Neosporose. Machos.

## ABSTRACT

In this study, we have evaluated the microscopic lesions and cellular immune responses in the central nervous system of seven goat fetuses from abortions by *N. caninum* and six male, young and adult goats, naturally infected. As a negative control, three fetuses and one adult goat were used. For this purpose immunohistochemical staining with anti CD3, CD79 $\alpha$ , GFAP, MHC- II antibodies was performed, RCA1 Lectin histochemistry, besides the nuclear marker of proliferating cell antigen (PCNA). Lesions found in fetuses consisted of multifocal areas of necrosis surrounded by glial cells and perivascular cuffs that focused mainly in regions of cerebral cortex, thalamus and brainstem. These lesions were either, or not, related to the presence of parasitic structures. In the central nervous system of young and adult male goats, similar lesions were found in four of the six goats positive for *N. caninum*, although these animals did not manifest any clinical signs. In three adult goats there was also a few multinucleated giant cells associated. The presence of the parasite was assessed by analysis of histopathology, immunohistochemistry and the polymerase chain reaction (PCR) evidencing the infection in seven of 10 fetuses and six of seven adult goats. The immunohistochemical staining of cells in areas of gliosis allowed us to characterize them as astrogliosis and microgliosis in *Neospora caninum* infections in fetuses and adults; there is a bias towards the response of monocytic lineage cells (macrophages and microglia) with lower participation of astrocytes. In fetuses, astrocytes were present in lesions near the white matter, and adult astrocytic lesions were present in the gray matter of three goats representing glial scars. In addition, there was the expression of MHC-II in endothelium and microglia, especially in adult goats and probably stimulated by the presence of the parasite in the tissue. With this study, we describe the presence of cysts of *N. caninum* in adult male goats, which has not been demonstrated to date in adult animals of any species and we characterized the cell types involved in the immune response in the CNS of these animals.

**Keywords:** Abortion, Goats, Adult males, Encephalitis, Gliosis, Neosporosis, Immunohistochemistry, PCR.

## LISTA DE FIGURAS

Segunda parte – Artigo

- Fig. 1. Neosporose em caprinos, caprino adulto 1 ao nascimento, apresentando incordenação e paresia de membros pélvicos..... 71
- Fig. 2. Neosporose em caprinos, caprino adulto 1, secção de córtex cerebral, à altura do sulco cruzado, demonstrando presença de células gigantes (setas) e manguito perivascular associado..... 71
- Fig. 3. Neosporose em caprinos, caprino adulto 4, corte histológico em região de óbex evidenciando um dos cistos de parede espessa dentro do citoplasma de um neurônio..... 72
- Fig. 4. Neosporose em caprinos, caprino adulto 3, marcação imunohistoquímica fortemente positiva, para *Neospora caninum*, demonstrando cisto de parede espessa em sistema nervoso central (Método biotina-estreptavidina-peroxidase, barra 50µm). 72
- Fig. 5. Neosporose em caprinos, caprino adulto 1, secção de córtex cerebral, técnica de lectinoistoquímica para RCA1, evidenciando predomínio de células micróglia em lesões de manguitos perivascular e migração destas células para o tecido adjacente (Método estreptavidina-peroxidase, barra 100µm)..... 73
- Fig. 6. Neosporose em caprinos, feto 4, área de gliose em tronco encefálico, notar a característica das células com núcleos arredondados e hipercromáticos (H&E, barra 100µm)..... 73
- Fig. 7. Neosporose em caprinos, feto 4, técnica de lectinoistoquímica para RCA1, evidenciando predomínio de micróglia em lesão de gliose, a mesma área apresentada na figura anterior (Método estreptavidina-peroxidase, barra 100µm)..... 74
- Fig. 8. Neosporose em caprinos, feto 8, região de medula lombar, foco de necrose circundado por células da glia, imunomarcção para GFAP demonstrando a presença de astrócitos circundando a lesão e emitindo prolongamentos para dentro desta (Método dual link system-HRP, barra 100µm)..... 74
- Fig. 9. Neosporose em caprinos, caprino adulto 1, secção de córtex demonstrando região de gliose, notar a característica das células com núcleos arredondados e hipercromáticos (H&E, barra 100µm)..... 75



Fig. 10	Neosporose em caprinos, caprino adulto 1, mesma região de gliose apresentada na figura anterior, células com forte marcação positiva para GFAP (Método dual link system-HRP, barra 100µm).....	75
Fig. 11	Neosporose em caprinos, feto 1, região de córtex, lesão de gliose com forte imunomarcação positiva para PCNA, demonstrando o predomínio de células com caráter proliferativo (Método dual link system-HRP, barra 100µm).....	76
Fig. 12	Neosporose em caprinos, caprino adulto 1, secção de córtex, células com forte imunomarcação para moléculas de MHC-II em lesões de manguito perivascular e gliose adjacente (Método dual link system-HRP, barra 100µm).....	76
Fig. 13	Neosporose em caprinos, feto 7, imunomarcação positiva para MHC-II em células presentes em lesões de gliose e manguitos perivascular. Região de medula lombar (Método dual link system-HRP, barra 100µm).....	77
Fig. 14	Neosporose em caprinos, caprino adulto 3, região de tálamo, manguito perivascular constituído por células imunomarcadas com anticorpo anti CD3 (Método dual link system-HRP, barra 100µm).....	77

## LISTA DE TABELAS

Segunda parte – Artigo

- Tabela. 1. Resultados referentes aos fetos caprinos quanto à idade gestacional (dias) presença e graduação das lesões, confirmação do parasito e presença e grau de marcação imuno-histoquímica ..... 69
- Tabela. 2. Resultados referentes aos caprinos machos jovens e adultos quanto à idade (em meses) presença e graduação das lesões, confirmação do parasito e presença e grau de marcação imuno-histoquímica..... 70

## SUMÁRIO

### Primeira parte

1.	INTRODUÇÃO .....	11
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1.	Neospora caninum.....	14
2.2.	IMUNOLOGIA DA GESTAÇÃO.....	16
2.3.	LESÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	17
2.4.	CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS E RESPOSTAS CELULARES NAS INFECÇÕES DO SISTEMA NERVOSO .....	19
2.4.1.	ASTRÓCITOS.....	19
2.4.2.	MICRÓGLIA.....	21
2.4.3.	OLIGODENDRÓCITOS.....	23
2.4.4.	REGULAÇÃO DA RESPOSTA MICROGLIOSE ASTROGLIOSE.....	23
2.4.5.	PAPEL DOS LINFÓCITOS NO SNC.....	24
2.4.6.	RESPOSTA Th NO SNC.....	25
2.4.7.	O MHC E A APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS.....	26
2.4.8.	PCNA.....	27
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30

### Segunda parte – Artigo

Caracterização de eventos imunopatológicos no sistema nervoso central de caprinos naturalmente infectados por <i>Neospora caninum</i> .....	36
---	----

**PRIMEIRA PARTE**  
**REFERENCIAL TEÓRICO DE *Neospora caninum***

## 1 INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um parasito intracelular conhecido por ser o principal causador de abortos em bovinos leiteiros e de corte em todo o mundo. O parasito tem como hospedeiros definitivos (HD) canídeos domésticos e selvagens e já foi isolado de ovelhas, búfalos, cães, cavalos, bisões e veado (DUBEY; SCHARES, 2011).

Apesar do papel do cão e de outros canídeos como HD, espalhando oocistos infectantes (ALMERIA et al., 2003), que infectam várias espécies animais por via oral, a transmissão vertical parece ser a principal fonte de infecção por *N. caninum* em rebanhos bovinos leiteiros (MACALDOWIE et al., 2004) e caprinos (MESQUITA et al., 2013), já que oocistos, presentes nas fezes, foram identificados apenas em poucos cães em todo o mundo e o número de oocistos liberados por eles, geralmente, é baixo (DUBEY; SCHARES, 2011).

A neosporose clínica em ruminantes se manifesta pela ocorrência de abortos recorrentes e falha reprodutiva com repetição de cio. Os abortos, em bovinos, ocorrem, geralmente, no período de 5 a 6 meses de gestação e os fetos podem morrer no útero, serem absorvidos, mumificados, macerados, nascerem mortos, nascerem vivos com sinais clínicos ou nascerem clinicamente normais, mas permanentemente infectados (DUBEY; SCHARES, 2011). Já em caprinos, poucos relatos de abortos ou falhas reprodutivas são descritos, sendo relatados casos de abortos, natimortos, nascimento de crias fracas com sinais clínicos e animais saudáveis persistentemente infectados ou não, apesar da mãe ser soropositiva (MESQUITA et al., 2013; VARASCHIN et al., 2012).

O aborto ocorre, após transmissão transplacentária, podendo ser considerada exógena, pela ingestão de oocistos liberados nas fezes de cães, ou endógena, pela recrudesência dos bradizoítos encistados para taquizoítos de rápida divisão (DUBEY; SCHARES, 2011; ROSBOTTON et al., 2008). Porém a grande maioria dos animais nasce clinicamente normal e o processo que

transforma uma infecção, aparentemente, inofensiva em uma doença fatal não está estabelecido (MACALDOWIE et al., 2004). Após a transmissão, não se sabe ao certo os mecanismos específicos causadores do aborto. Possivelmente, fatores como o período da primeira infecção e de recrudescência da infecção em animais persistentemente infectados, os efeitos da gestação na imunidade materna, cepa parasitária, a suscetibilidade do hospedeiro e o estágio de desenvolvimento fetal, em que a infecção foi adquirida, influenciam na ocorrência ou não do aborto. Alguns autores sugerem uma patogênese imunomediada (QUINN; ELLIS; SMITH, 2002), porém esta hipótese é controversa; para outros autores, ela está relacionada, mas não é a principal causa (ROSBOTTOM et al., 2011). Vários trabalhos correlacionam a participação de citocinas na polarização de uma resposta imune T-helper 1 (Th1) ou T-helper 2 (Th2), como fator desencadeador de eventos celulares específicos que causariam as lesões que levam ao aborto (MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2008, 2011). A resposta pró-inflamatória Th1 com a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é conhecida por ser efetiva em limitar a multiplicação do parasito (INNES et al., 1995). Esta resposta é diminuída na gestação normal, favorecendo a sobrevivência e a multiplicação do parasito (INNES et al., 2001). Já, para Entrican (2002), estas citocinas pró-inflamatórias podem levar à destruição de células maternas da placenta e levar ao aborto.

Entretanto, em estágios mais avançados da gestação, é provado que tanto a mãe quanto o feto conseguem desenvolver uma resposta imunológica protetora, que é compatível com o andamento da gestação, apesar de que o feto pode ser infectado pelo protozoário (BARTLEY et al., 2004; MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2011).

Geralmente fetos que sofreram aborto por *N. caninum* apresentam infiltrado inflamatório mononuclear em vários órgãos, entretanto, as lesões mais

significantes se encontram no SNC, na musculatura cardíaca e esquelética (VARASCHIN et al., 2012). Os relatos de encefalite, geralmente, incluem lesões como múltiplos focos de necrose, acompanhados de gliose, geralmente adjacentes a capilares com endotélio reativo e manguitos perivasculares de células mononucleares (BARR et al., 1990; BUXTON et al., 1997; MORALES et al., 2001; VARASCHIN et al., 2012). Lesões semelhantes às encontradas nos fetos, mas não tão acentuadas, foram relatadas em uma vaca (SAWADA et al., 2000) e em um carneiro (BISHOP et al., 2010). A gliose é um achado constante no SN de fetos abortados por *N. caninum* e é, geralmente, classificada como microgliose ou gliose, sem distinção fenotípica das células presentes (BARR et al., 1990; BUXTON et al., 1997; MORALES et al., 2001; VARASCHIN et al., 2012). Sendo assim, estudos fenotípicos da resposta celular do tecido nervoso se fazem necessários para o entendimento da patogenia da neosporose.

A resposta imunológica mediada por células é importante na proteção contra *N. caninum*, entretanto não é claro como ocorre a resposta imune contra este agente no SNC, que é um sistema imunoprivilegiado. É conhecido que a resposta Th1 é protetora contra o protozoário, porém a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de radicais livres contra o agente pode ser diretamente danosa às células do SNC (ALOISI, 2001; JESUS et al., 2013; ZHANG et al., 2010).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de contribuir para o conhecimento da resposta imunológica relacionada com a patogenia da infecção por *N. caninum* no SNC de fetos caprinos abortados e machos jovens e adultos, por meio da caracterização imuno-histoquímica das células, associando com suas funções e o complexo maior de histocompatibilidade, presentes nestes tecidos, além de caracterizar as lesões histológicas observadas no SNC destes animais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Neospora caninum*

*Neospora caninum* é um protozoário Apicomplexa que pertence à Família Sarcocystidae (DUBEY et al., 1988), sendo considerado a principal causa de aborto em bovinos em vários países (DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996). Esse protozoário é, estruturalmente, muito semelhante à *Toxoplasma gondii*, mas, antígenicamente, distinto (MINEO et al., 2001) e possui o cão (*Canis familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (Gray Wolf) (*Canis lupus*) (DUBEY; SCHARES, 2011) como HD.

No ciclo de vida do parasito, os HD eliminam oocistos não esporulados nas fezes, após a ingestão de tecidos ou órgãos de hospedeiros intermediários (HI), provavelmente, pela ingestão de membranas placentárias de animais contendo cistos teciduais. Fora do HD, os oocistos podem esporular em 24 h (DIJKSTRA et al., 2002; LINDSAY et al., 1995).

Em caprinos, há poucos relatos de abortos, natimortos ou nascimento de cabritos fracos associados à infecção por *N. caninum* (BARR et al., 1992; CORBELLINI; COLODEL; DRIEMEIER, 2001; DUBEY, 2003; ELENÍ et al., 2004; LINDSAY et al., 1995; MESQUITA et al., 2013; VARASCHIN et al., 2012). Levantamentos sorológicos têm sido realizados em várias regiões do Brasil. A frequência de infecção, encontrada nos rebanhos estudados em Minas Gerais, foi de 10,7% (VARASCHIN et al., 2011), sendo esta maior que a relatada por outros autores que utilizaram a mesma metodologia para *N. caninum*, como 1,05% em Mossoró, RN (LIMA et al., 2008), 3,3% em Patos, PB (FARIA et al., 2007), 6,34% no estado de São Paulo (FIGLIUOLO et al.,



2004). No estado da Bahia, valores maiores foram obtidos, onde 15% das cabras testadas foram reagentes (RIFI  $\geq$ 1:100) ao *N. caninum* (UZÊDA et al., 2007).

Nos ruminantes, a infecção intrauterina é a principal forma de transmissão de *N. caninum*. A transmissão congênita é de extrema importância na neosporose, de tal forma que, em rebanhos bovinos infectados, 81% a 95% de vacas soropositivas podem transmitir a infecção para suas crias (WOUDA; DUBEY; JENKINS, 1999). Pesquisas indicam que vacas soropositivas são mais propensas a abortar em relação às soronegativas. Há um aumento nos títulos de anticorpos quatro a cinco meses antes do parto, sugerindo que ocorre reativação de infecção latente. Pouco se conhece sobre esse mecanismo de reativação, embora se suspeite que ocorra parasitemia, durante a gestação, levando à infecção fetal (DUBEY, 2003).

Lesões macroscópicas, associadas à neosporose, são raras, sendo descritas em cabras somente hidrocefalia com hipoplasia de cerebelo (DUBEY et al., 1996) e um quadro de porencefalia, caracterizada por ausência de substância branca cerebral, com consequente dilatação dos ventrículos laterais pela perda de tecido (hidrocefalia ex-vácuo) (VARASCHIN et al., 2012). As lesões microscópicas são muito utilizadas no diagnóstico do aborto por *N. caninum* e o exame histopatológico deve ser realizado em tecidos de fetos abortados ou em bezerros fracos. Os órgãos de eleição para o diagnóstico histopatológico são encéfalo, coração, fígado (DUBEY et al., 2006), músculo esquelético e pulmão, estes dois últimos, principalmente, nos casos de autólise do encéfalo (PESCADOR et al., 2007).

A placenta, também, pode apresentar lesões significativas na neosporose, porém nem sempre está disponível para o exame histopatológico. Autores que analisaram placentomas na sua totalidade descrevem lesões como extravasamento de soro entre os tecidos materno e fetal, focos de inflamação não supurativa no septo materno e necrose do mesênquima de trofoblastos nas

vilosidades fetais, com necrose tanto do tecido fetal como materno do placentoma. Infiltrado inflamatório misto, contendo neutrófilos, eosinófilos (estes no septo materno), linfócitos, histiócitos e macrófagos pode ser observado (MALCADOWIE et al., 2004). Podem estar presentes taquizoítos associados às áreas necróticas dos vilos placentários fetais e bradizoítos nos trofoblastos (BARR et al., 1990; MALEY et al., 2006). Placentas oriundas dos abortos e natimortos, em cabras, apresentaram lesões acentuadas, caracterizadas, principalmente, por necrose, envolvendo o mesênquima dos vilos corioalantoídeos e as células trofoblásticas, além de inflamação mononuclear, por vezes associada a infiltrado neutrofílico (MESQUITA et al., 2013).

## **2.2 Imunologia da gestação**

A gestação é um evento único e complexo presente nos mamíferos e envolve uma série de mecanismos regulatórios, por parte do sistema imune da mãe e do feto, já que o feto pode ser considerado um aloenxerto, por possuir determinantes antigênicos tanto da mãe, quanto do pai. Vários mecanismos, relacionados ao sucesso da não rejeição do aloenxerto, são hoje conhecidos. Porém, esses fatores podem entrar em situação de risco, quando estão presentes agentes infecciosos na placenta, como *Neospora caninum*, que pode causar danos ao sistema de tolerância da gestação (ENTRICAN, 2002).

Uma resposta imune celular é tida como importante fator para proteção contra infecção. A resposta imune Th2 é considerada necessária para a manutenção da gestação. Já a resposta materna Th1, onde mediadores desta resposta como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  podem ser prejudiciais às células da placenta levam ao aborto. Quando a infecção ocorre em estágios mais avançados da gestação, a capacidade de resposta imunológica do feto pode determinar o

sucesso da prenhez (BARTLEY et al., 2004; MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2011).

A polarização Th1 está sempre relacionada com células expressando IFN- $\gamma$  na interface materno-fetal. Grandes quantidades de células T CD4<sup>+</sup> foram identificadas (IHQ) no septo das carúnculas de vacas infectadas experimentalmente por *N. caninum*, aos 70 dias de gestação, juntamente com a expressão de IFN- $\gamma$  por hibridização *in situ*. (MALEY et al., 2006). Já Orozco, Morales e Salmeron (2012) e Rosbottom et al. (2008) demonstraram que células CD4<sup>+</sup> estavam presentes em grandes quantidades nos septos carunculares de vacas prenhas infectadas por *N. caninum*.

### **2.3 Lesões no sistema nervoso central**

Fetos que sofrem aborto por *N. caninum* apresentam lesões de encefalite mononuclear associada com múltiplos focos de necrose e gliose (BARR et al., 1990; BUXTON et al., 1997; MORALES et al., 2001; VARASCHIN et al., 2012). Entende-se por gliose uma resposta não específica de células neurogliais em resposta a várias formas de injúria. A área do SNC com gliose encontra-se hiper celular por hipertrofia celular, proliferação celular ou ambos (SUMMERS, 1997). Alguns autores usam a denominação de microgliose e outros gliose, porém nesses trabalhos não foi realizada distinção fenotípica das células presentes na lesão (BARR et al., 1990; VARASCHIN et al., 2012), o que seria importante, já que reações de microgliose sempre tendem a estar acompanhadas de astrogliose, em virtude de fatores estimulantes produzidos pela micróglia (STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004). Alguns estudos sugerem que a gliose, resultante da proliferação celular, é mais característica da micróglia do que da astróglia (SUMMERS, 1997).

O aumento do número de células resulta da proliferação *in situ* ou de recrutamento, uma vez que as células gliais podem migrar. Estudos com transplantes demonstraram que os astrócitos imaturos têm uma capacidade considerável de migrar dentro do SNC (SUMMERS, 1997).

Os relatos de encefalite, geralmente, incluem lesões como múltiplos focos de necrose acompanhados de gliose, geralmente, adjacentes a capilares com endotélio reativo e manguitos perivasculares de células mononucleares. Também se descrevem focos aleatórios de necrose na substância branca do tronco cerebral que varia de focos de axônios edemaciados e os inofílicos a focos de necrose circundados por células da glia (BARR et al., 1990; BUXTON et al., 1997; MORALES et al., 2001; VARASCHIN et al., 2012). Lesões semelhantes, mas menos intensas que as encontradas em fetos, foram relatadas em uma vaca, na qual o parasito foi isolado do SNC por inoculação em camundongos nude, mas não foi encontrado na IHQ (SAWADA et al., 2000) e, em um carneiro, no qual a identificação da presença do parasito se deu pela identificação do DNA do agente, no SNC, por reação de PCR (BISHOP et al., 2010). Em um caso isolado, há relato de porencefalia associado à presença do parasito em um natimorto caprino, com o diagnóstico confirmado pela técnica de IHQ. Neste animal e no rebanho, o diagnóstico diferencial para duas etiologias que poderiam estar associados à porencefalia, como o vírus da Bluetongue e a deficiência de cobre, foi realizado, sendo negativos (VARASCHIN et al., 2012).

A presença de *Neospora caninum* nos tecidos, principalmente na forma de cistos contendo bradizoítos, frequentemente, é constatada sem reação inflamatória adjacente (BARR et al., 1990; BUXTON et al., 1997; MORALES et al., 2001; VARASCHIN et al., 2012).

## **2.4. Caracterização de células e respostas celulares nas infecções do sistema nervoso**

O SNC é formado por células parenquimatosas, representadas pelos neurônios e pela neuroglia, compostas por astrócitos, oligodendrócitos e células microgliais. A neuroglia pode, ainda, ser dividida em macroglia (astrócitos e oligodendrócitos) e microglia (micróglia) (SUMMERS, 1997). O SNC é um ambiente imunoprivilegiado, protegido pela barreira hematoencefálica, que restringe o trânsito de células entre o SNC e o sangue e, também, pela ausência de vasos linfáticos, impedindo o egresso de antígenos do SNC e sua apresentação a células especializadas. Entretanto, esta proteção não é completa e há certo tráfego de células e moléculas através da barreira hematoencefálica e transporte de antígenos a linfonodos regionais (BECHER; PRAT; ANTEL, 2000).

### **2.4.1 Astrócitos**

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC. Possuem funções diversas como síntese de neurotransmissores, controle de neurotransmissores e íons nas sinapses, regulação da função dos oligodendrócitos, manutenção das células tronco neurais em seu desenvolvimento, restauração da barreira hematoencefálica, suporte para o crescimento axonal, nutrição de neurônios, indução da cicatrização glial e estão envolvidos com a detoxificação da amônia no tecido nervoso. Na histologia, mediante colorações histoquímicas adequadas, impregnação metálica ou coloração imuno-histoquímica para proteína ácida fibrilar glial (GFAP), pode-se observar o corpo celular e as extensas ramificações e interconexões dos processos astrocitários (ZACHARY, 2009). Os astrócitos têm grande função, em processos inflamatórios do encéfalo,

participando em reações de gliose, que são reações inflamatórias comuns e não específicas do SNC (SUMMERS, 1997). São células prontamente preparadas a responder à agressão do SNC (SUMMERS, 1997; ZHANG et al., 2010).

A interação entre os astrócitos, a micróglia e os neurônios orquestram as reações imunes no cérebro. Neste contexto, os astrócitos podem expressar os antígenos do complexo de histocompatibilidade maior classe I e II, uma variedade de citocinas e quimiocinas e moléculas de adesão, que modulam eventos inflamatórios no SNC (ZHANG et al., 2010). Os astrócitos, também, secretam fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular, que têm papel não somente no desenvolvimento, mas também no reparo do SNC (ZACHARY, 2009).

Os astrócitos reativos apresentam como característica o aumento na produção de neurofilamentos intermediários, como GFAP e vimentina, acompanhado de hipertrofia e hiperplasia das células na região afetada. A reatividade acompanhada do aumento de astrócitos pode ser chamada de astrogliose, que pode ser proliferativa; quando os astrócitos da região afetada se multiplicam no local, ou recrutativa; quando os astrócitos, principalmente, os jovens, migram para o local de inflamação. Esta reação pode ser um mecanismo pelo qual o SNC tentaria restaurar a homeostase, isolando a região afetada (STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004; SUMMERS, 1997; ZHANG et al., 2010).

Entretanto, a função dos astrócitos reativos pode estar ligada tanto a efeitos benéficos como degenerativos do SNC. Sua reatividade pode ser desencadeada a partir de agressão a qualquer célula do SNC. Pode ser induzida por trauma, isquemia, infecções, várias doenças neurológicas e exposição a agentes químicos variados. Astrócitos reativos podem produzir citocinas pró-inflamatórias, que são prejudiciais aos neurônios e oligodendrócitos no cérebro lesionado, podendo levar a danos posteriores relacionados à produção de TNF- $\alpha$

e radicais de óxido nítrico (ZHANG et al., 2010). A formação de cicatriz cerebral inibe funções de regeneração axonal e remielinização. Também há relatos de sua participação subjacente ao agravamento de dano celular, na região cerebral afetada em modelos de várias doenças do SNC, de humanos como epilepsia, esclerose múltipla, HIV, acidente vascular cerebral, isquemia, dentre outras (NIQUET; BEN-ARI; REPRESA, 1994; ZHANG et al., 2010).

Quando o foco são doenças causadas por protozoários, em um estudo experimental *in vitro* realizado com *Toxoplasma gondii*, observou-se que um fator crítico, para o controle da toxoplasmose cerebral, está ligado à ativação de astrócitos por meio de IFN- $\gamma$ , que expressa uma proteína, gp130, em resposta ao IFN- $\gamma$ . Esses astrócitos demonstram capacidade para sobreviver nos sítios das lesões causadas pelo parasito e a proteína gp130 é capaz de mediar um incremento do controle do parasito em astrócitos infectados (DROGEMULLER et al., 2008).

#### **2.4.2 Micróglia**

A micróglia é caracterizada por células de corpo pequeno e com poucos processos citoplasmáticos ramificados. Compreende cerca de 10-12% da população de células do encéfalo (SUMMERS, 1997). Elas são consideradas macrófagos residentes do SNC com funções especializadas, porém compartilham muitas funções com os macrófagos de origem mieloide, pois têm origem a partir de um precursor mieloide comum. A micróglia expressa marcadores celulares como RCA1 e marcadores de células de origem mieloide como o antígeno comum leucocitário (CD45), CD14, CD68, moléculas de

MHC, receptores de quimiocinas e muitos outros (BECHER; PRAT; ANTEL, 2000; GRETER; MERAD, 2013; SUMMERS, 1997; ZHANG et al., 2010).

Suas funções compreendem monitoramento das funções do SNC, sendo assim, mantenedoras da homeostase, relacionada à alta motilidade de seus processos ramificados e constante remoção de debris celulares, agindo de forma reparativa (ZHANG et al., 2010).

Outras funções da micróglia estão relacionadas à resposta a agressões, após um estímulo de dano ao SNC, com vários agentes ativadores (ALOISI, 2001; BECHER; PRAT; ANTEL, 2000; STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004; SUMMERS, 1997; ZHANG et al., 2010). A micróglia pode ser ativada por diversos fatores, como agentes infecciosos virais e bacterianos, trauma, isquemia e outros fatores relacionados a dano neuronal (ALOISI, 2001; BECHER; PRAT; ANTEL, 2000; GRETER; MERAD, 2013). Na ativação a micróglia, passa o seu estado ramificado de repouso para um estado de morfologia ameboide. Na inflamação há evidências constantes de recrutamento de progenitores mieloides da micróglia para o SNC, porém é incerta se a função das células migradas é tão eficiente quanto a micróglia residente (GRETER; MERAD, 2013). Além dos estímulos inflamatórios, o contato da micróglia, com células derivadas da corrente sanguínea, também, estimula sua ativação. A micróglia ativada desempenha papel de agente do sistema imune inato, induzindo inflamação, citotoxicidade e regulação da resposta de linfócitos T, pela apresentação de antígenos. Pode regular a resposta entre Th1 e Th2, além de manter a integridade celular frente a agentes danosos visando à proteção do ambiente imunoprotégido do SNC (ALOISI, 2001; BECHER et al., 2013; SUMMERS, 1997; ZHANG et al., 2010). A ativação de linfócitos pela micróglia está relacionada ao antígeno CD40, que se liga a um ligante (CD40L) expresso em linfócitos. Neurônios normais podem inibir a apresentação de antígenos do SNC pela micróglia



considerando o receptor CD40, responsável pela liberação de neurotrofinas (ALOISI, 2001).

Em algumas circunstâncias, a micróglia pode se tornar “sobreativada” e induzir efeitos neurotóxicos danosos ao SNC, relacionados à liberação de agentes pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> e IFN- $\gamma$ , bem como agentes de estresse oxidativo (óxido nítrico, peróxido de hidrogênio) que são tóxicos aos neurônios (ALOISI, 2001; ZHANG et al., 2010). A atividade funcional normal dos neurônios inibe a produção de fatores pró-inflamatórios liberando substâncias que agem contra os ativadores da micróglia, como as citocinas da resposta Th1 e

#### **2.4.3 Oligodendrócitos**

Os oligodendrócitos têm pequeno corpo celular e alguns processos citoplasmáticos ramificados são as células menos reativas nos processos patológicos do SNC e são conhecidos, principalmente, pela sua reação à degeneração neuronal, fenômeno identificado como satelitose. Sua principal função no SNC é a formação e a manutenção da bainha de mielina (SUMMERS, 1997).

#### **2.4.4 Regulação da resposta microgliose/astrogliose**

Após o desencadeamento da resposta inflamatória, a micróglia é a primeira linhagem de células a ser ativada no SNC, atuando como agente do sistema imune inato. Posteriormente, as reações de microgliose podem ser complementadas por astrogliose. Fatores pró-inflamatórios, liberados pela

micróglia, são importantes desencadeadores e moduladores da astrogliose. Em reações com ativação microglial reduzida, o número de astrócitos, também, está reduzido, demonstrando uma interrelação entre as duas linhagens celulares no SNC (ALOISI, 2001; ZHANG et al., 2010).

Os astrócitos, também, demonstram ser importantes na regulação da microgliose, principalmente, pela produção de TGF- $\beta$ , que reduz a atividade secretória de agentes pró-inflamatórios da micróglia, que, em excesso, podem ocasionar danos ao microambiente do SNC (ALOISI, 2001).

#### **2.4.5 Papel dos linfócitos no SNC**

Os linfócitos são ativados no SNC pela micróglia, porém há suposições de que a ativação de linfócitos T no SNC não é completa, culminando com sua rápida destruição, o que condiz, também, com a grande quantidade de células T apoptóticas no parênquima do SNC durante quadros de encefalite auto-imune (ALOISI, 2001). O verdadeiro papel de células T no SNC não é bem esclarecido, sendo muitas vezes considerado como não significativo na patogênese de certas doenças (CAPLAZI; EHRENSPERGER, 1997).

Quadros de neosporose em fetos, geralmente, estão relacionados à presença de infiltrados perivasculares de linfócitos (BARR et al., 1990; BUXTON et al., 1997; MORALES et al., 2001; VARASCHIN et al., 2012) e, também, observados em um caso de neosporose no cérebro de bovino adulto (SAWADA et al., 2000), porém a distinção imuno-histoquímica de linfócitos nesses casos não foi feita. Na Doença de Borna em ovinos, os linfócitos, em manguitos perivasculares, foram caracterizados por imuno-histoquímica como sendo, principalmente, linfócitos T CD3<sup>+</sup>, dos quais os linfócitos T CD4<sup>+</sup> estavam presentes em maior quantidade que os CD8<sup>+</sup>, porém, em alguns casos, a

relação estava invertida. Linfócitos B eram encontrados em pequena quantidade (CAPLAZI; EHRENSPERGER, 1997).

Em um estudo sobre a resposta imune cerebral contra *Listeria monocitogenes*, havia linfócitos T que mostram estar em grande quantidade, principalmente, em espaços perivasculares associados a micro abscessos e em menor número, no parênquima cerebral. Grandes quantidades de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram observadas na encefalite aguda. Nestes casos, diferenças significativas na polarização da resposta CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> foram encontradas somente em caprinos com maior expressão de Células T CD4<sup>+</sup>. Em bovinos, ainda, foram observadas algumas células T *Natural Killer* (DI PALMA et al., 2012).

#### **2.4.6 Resposta th1 no snc**

Semelhante a outros sistemas, o SNC, também, está sujeito a respostas imunes polarizadas em Th1 e Th2. A resposta Th1 está relacionada à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , porém tais citocinas estão relacionadas a dano direto a oligodendrócitos e neurônios. A resposta Th1 e, também, Th2 estimulam a produção de PGE<sub>2</sub>, que é um potente regulador da resposta Th1; funciona, assim, como um agente limitante da resposta Th1 exacerbada, evitando sobreativação da micróglia e danos subsequentes. A polarização Th1 é estimulada, principalmente, pela produção de IFN- $\gamma$  e a partir da sua liberação, vários efeitos serão induzidos no SNC como a amplificação da resposta antimicrobial, pró-inflamatória e apresentadora de antígenos da micróglia. Receptores de IFN- $\gamma$  estão presentes na micróglia em repouso e na

sua presença há intenso estímulo para expressão de moléculas de MHC-II (ALOISI, 2001; BECHER; PRAT; ANTEL, 2000).

Nas infecções por *N. caninum*, a resposta Th1 é demonstrada como sendo preferencial e protetora contra o agente, porém os mecanismos de resposta do SNC, frente a infecções parasitárias, não são muito claros. A presença de IFN- $\gamma$  em culturas de astrócitos e micróglia, infectadas por *N. caninum*, demonstrou ter um controle sobre a proliferação do parasito, enquanto que a presença de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 está relacionada à sobrevivência intracelular em neurônios, durante estimulação de células cultivadas na presença de IFN- $\gamma$ , demonstrando, assim, serem fatores de persistência do agente nos tecidos (JESUS et al., 2013). Na toxoplasmose, o controle da infecção está relacionado, também, à resposta Th1, com a produção de IFN- $\gamma$  bem como a migração de células TCD8<sup>+</sup>. A produção de IFN- $\gamma$ , também, leva à produção de fatores protetores, como TNF- $\beta$  e outras citocinas.

#### **2.4.7 O MHC e a apresentação de antígenos**

Em condições normais a barreira hematoencefálica restringe a migração de células sanguíneas para o parênquima do sistema nervoso, entretanto, em casos de inflamação as células endoteliais podem promover a ativação de células T específicas contra antígenos de agentes agressores. Constitutivamente, as células endoteliais não expressam moléculas de MHC-II, mas o IFN- $\gamma$  pode induzir a expressão de MHC-II pelas células endoteliais promovendo, assim, a apresentação de antígenos à célula T (ALOISI, 2001).

Ao redor de vasos sanguíneos das meninges e plexo coroide, há macrófagos e células dendríticas, que expressam, constitutivamente, moléculas de MHC-II, contribuindo, assim, para a apresentação antigênica a células T, diferentemente da micróglia residente do SNC, que comumente não expressa o

MHC-II. À presença de virtualmente qualquer estímulo inflamatório, a micróglia ativada responde prontamente com a expressão de MHC-II (ALOISI, 2001).

Os astrócitos, também, demonstram a capacidade de expressão de MHC-II sob a presença de IFN- $\gamma$ , embora seu papel na apresentação antigênica, ainda, não seja claro. Alguns estudos sugerem que a astrogliia fetal humana, ao expressar MHC-II, favorece a indução de um estado anérgico das células T, contribuindo, assim, para a regulação da inflamação (BECHER; PRAT; ANTEL, 2000).

Em ovinos, infectados pelo vírus da Doença de Borna, a expressão de MHC-I foi observada, utilizando a técnica de imuno-histoquímica, em vasos e células inflamatórias ao seu redor. Já o MHC-II foi expresso por células inflamatórias e vasculares, mas também por astrócitos. Caprinos, ovinos e bovinos com lesões de listeriose no cérebro apresentam alta expressão de moléculas de MHC-II em células do infiltrado perivascular e, em menor quantidade, nas células dos vasos, demonstrando que tais células estão ativas à infecção (CAPLAZI; EHRENSPERGER, 1997).

#### **2.4.8 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)**

O PCNA é uma proteína nuclear estável, regulada pelo ciclo celular, cujo grau de síntese está diretamente relacionado ao número de células em proliferação. O uso desta marcação veio substituir a contagem de células em mitose, uma vez que, dentro de uma população celular em proliferação, a fase de mitose (fase M) é a mais curta e tem o menor número de células entre as que estão em proliferação (LINDEN et al., 1992). Não há estudos que caracterizam a resposta glial em animais infectados por *N. caninum*, quanto ao comportamento proliferativo ou migratório das células no foco da lesão. Segundo Wrobel, Bickel e Kujat (1996), o anticorpo monoclonal contra o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA), pode ser usado para identificar células que

estão ativas no ciclo celular, sendo possível, assim, caracterizar em um foco de lesão glial se as células presentes estão em atividade, diferenciando, principalmente, lesões ativas de possíveis cicatrizes gliais de processos que podem ter ocorrido durante a vida fetal do indivíduo.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho é um estudo inédito da análise da resposta imune celular no sistema nervoso central de caprinos jovens, adultos e fetos infectados naturalmente por *N. caninum*. Visa contribuir para o entendimento dessas lesões e demonstrar que o caprino tem potencial para ser utilizado como modelo experimental no estudo da patogenia e eventos celulares que ocorrem na neosporose em outras espécies, como os bovinos.

Conclui-se, neste estudo, que a resposta celular no SNC de caprinos é voltada para a ativação de células da linhagem monocítica, sem a participação significativa de células de linhagem linfocitária e menor participação de astrócitos em lesões agudas, apesar destes se localizarem, periféricamente, aos centros de necrose. A quantidade de astrócitos, em animais adultos, foi maior em regiões de cicatrização glial. A presença de células, expressando moléculas de MHC-II, permite-nos destacar que a infecção no sistema nervoso dos machos adultos é, ainda, ativa e polarizada para Th1 e o fato dessa molécula não ser expressa nas lesões fetais pode ser pelo tempo de evolução das lesões ou interferência da polarização de uma resposta Th2 materna. Destaca-se, também, a necessidade de mais estudos em animais machos, já que predominam experimentos na literatura com fêmeas. É importante saber a participação do macho e qual seria a importância deste como mantenedor do parasito nos rebanhos, dado o potencial risco de consumo de tecidos de animais de descarte por caninos.

## REFERÊNCIAS

- ALMERIA, S. et al. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 383-392, July 2003.
- ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 165-179, Oct. 2001.
- BARR, B. C. et al. Bovine fetal encephalitis and Myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 27, n. 5, p. 354-361, Sept. 1990.
- BARR, B. C. et al. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, n. 1, p. 365-367, July 1992.
- BARTLEY, P. M. et al. Maternal and fetal immune response of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 130, n. 2/3, p. 81-91, Apr. 2004.
- BECHER, B.; PRAT, A.; ANTEL, J. P. Brain immune connection: immunoregulatory properties of CNS-resident cells. **Glia**, New York, v. 29, n. 4, p. 293-304, Feb. 2000.
- BISHOP, S. et al. The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 1/2, p. 137-142, Jan. 2010.
- BUXTON, D. et al. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 117, n. 1, p. 1-16, July 1997.
- CAPLAZI, P.; EHRENSPERGER, F. Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 61, n. 2/4, p. 203-220, Feb. 1997.



COBERLLINI, L. G.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 13, n. 5, p. 416-419, Sept. 2001.

DI PALMA, S. et al. Comparative spatiotemporal analysis of the intrathecal immune response in natural listeric rhombencephalitis of cattle and small ruminants. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 429-441, Sept. 2012.

DIJKSTRA, T. et al. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 3/4, p. 220-225, Apr. 2008.

DROGEMULLER, K. et al. Astrocyte gp130 expression is critical for the control of *Toxoplasma* Encephalitis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 181, n. 4, p. 2683-2693, Aug. 2008.

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

DUBEY, J. P. et al. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schamburg, v. 193, p. 1269-1283, 1988.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p. 1-59, Dec. 1996.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals: the last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 1/2, p. 90-108, Aug. 2011.

ELENI, C. et al. Detection of *Neospora caninum* in a aborted goat foetus. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, n. 3/4, p. 271-274, Sept. 2004.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 126, n. 2/3, p. 74-94, Feb. 2002.

FARIA, E. B. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos City, Paraíba state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 1/2, p. 126-129, Mar. 2007.

FIGLIUOLO, L. P. C. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 29-32, Feb. 2004.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 159-161, Feb. 2004.

GRETER, M.; MERAD, M. Regulation of microglia development and homeostasis. **Glia**, New York, v. 61, n. 1, p. 121-127, Jan. 2013.

INNES, E. A. et al. Interferon-gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as show by incorporation of <sup>3</sup>H Uracil. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 115, n. 1, p. 95-100, July 1995.

INNES, E. A. et al. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal of Parasitology**, New York, v. 31, n. 13, p. 1523-1534, Nov. 2001.

JESUS, E. E. V. et al. Effects of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 133, n. 3, p. 269-274, Mar. 2013.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 945-950, July 2010.

LIMA, J. T. R. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 81-86, Nov. 2008.

LINDSAY, D. S. et al. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pigmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 9, p. 1176-1180, Sept. 1995.

MACALDOWIE, C. et al. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 131, n. 2/3, p. 142-156, Oct. 2004.

MALEY, S. W. et al. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 135, n. 3, p. 130-141, Oct. 2006.

MCALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, Sept. 1998.

MESQUITA, L. P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 327-333, Sept. 2013.

MINEO, T. W. P. et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 98, n. 4, p. 239-245, July 2001.

MORALES, E. et al. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 125, n. 1, p. 58-63, July 2001.

NIQUET, J.; BEN-ARI, Y.; REPRESA, A. Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. **Journal of Neurocytology**, Boston, v. 23, n. 10, p. 641-656, Oct. 1994.

OROZCO, M. A.; MORALES, E.; SALMERON, F. Characterization of the inflammatory response in the uteri of cows infected naturally by *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 148, n. 2/3, p. 1-9, Feb. 2012.

PESCADOR, C. A. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1/2, p. 159-163, Nov. 2007.

QUINN, H. E.; ELLIS, T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause of immune mediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 391-394, Sept. 2002.

ROSBOTTOM, A. et al. Up regulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. **Infection and Immunity**, Washington, v. 76, n. 6, p. 2352-2361, June 2008.

ROSBOTTOM, A. et al. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with neospora caninum. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. 1-16, Jan. 2011.

SAWADA, M. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected cow. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 247-252, June 2000.

STREIT, W. J.; MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 1, p. 1-14, Oct. 2004.

SUMMERS, B. A. **Veterinary neuropathology**. Baltimore: Mosby, 1997. 527 p.

UZÊDA, R. S. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 70, n. 2/3, p. 257-259, July 2007.

VARASCHIN, M. S. et al. Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 50, n. 1, p. 63-67, Mar. 2012.

VARASCHIN, M. S. et al. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 53-58, Jan. 2011.

WOUDA, W.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 3, p. 545-547, June 2007.

WROBEL, K. H.; BICKEL, D.; KUJAT, R. Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibody against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Cellular Tissue Research**, New York, v. 283, n. 2, p. 191-201, Feb. 1996.

ZACHARY, J. F. Sistema nervoso central. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Ed.). **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 833-952.

ZHANG, D. et al. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? **Molecular Neurobiology**, New York, v. 41, n. 2/3, p. 232-241, June 2010.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**CARACTERIZAÇÃO DE EVENTOS IMUNOPATOLÓGICOS EM  
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAPRINOS NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Neospora caninum***

Este artigo foi redigido de acordo com as normas da revista *Veterinary Parasitology*.

**Characterization of immunopathologic events in the central nervous system of goats naturally infected by *Neospora caninum***

Rafael C Costa, Debora R Orlando, Camila C Abreu, Karen Y Nakagaki, Leonardo P Mesquita, Aline C Silva, Lismara C Nascimento, Paulo C Maiorka, Ana P Peconick, Djeison L Raymundo, Mary S Varaschin

**Abstract**

It was evaluated lesions and the cellular immunological response in the central nervous system of eight goat fetuses and six male goats infected with *N. caninum*. For this purpose, lectin-histochemistry (RCA1) and immunohistochemical labeling (anti-CD3, CD79 $\alpha$ , GFAP, MHC-II, and PCNA antibodies) were used. In the fetuses, the microscopic lesions consisted of perivascular cuffs of mononuclear cells and multifocal necrosis surrounded by glial cells, which were predominant in the cerebral cortex, thalamus and brainstem. Parasitic cysts were observed related or not to the lesions. Similar lesions were found in four of the six male goats and giant cells related to focal gliosis were found in three goats. Parasitic cysts were found in three goats. The presence of *N. caninum* was evaluated by histopathology, immunohistochemistry (IHC) and PCR tests. The lectin-histochemistry labeling demonstrated that the cells in the perivascular cuffs and gliosis founded in the fetuses and goats were predominantly from the monocytic-lineage (macrophages and microglia). The anti-GFAP immunostaining showed the presence of

astrocytes in some necrotic lesions and in areas of glial scar. The expression of MHC by the microglia and the endothelial cells of the central nervous system, mainly in the adult goats, suggest a predominantly type Th1 immune response. Four foetuses and one adult male that were not infected with *N. caninum* were used as a negative control.

**Key words:** Abortion, Encephalitis, Immunopathology, Neosporosis, Immunohistochemistry, PCR.

## **Introduction**

*Neospora caninum* is an apicomplexan protozoan of the family Sarcocystidae [1], that has as definitive hosts dogs (*Canis familiaris*) [2], coyotes (*Canis latrans*) [3], dingos (*Canis lupus dingo*) [4], and grey wolves (*Canis lupus*) [5]. Neosporosis is considered worldwide the major cause of abortion in bovines and the congenital infection is the main cause of maintaining the agent in herds [6]. Many cases of reproductive problems associated with *N. caninum* in goats have been described [7, 8, 9,10,11], but the birth of healthy and not infected animals was also observed [12].

In the aborted foetuses, the main lesions found in the central nervous system (CNS) are multifocal necrosis, gliosis, perivascular mononuclear cell cuffs, and the presence of *N. caninum* in tissue sections [11,13,14,15].



It was observed similar lesions to those found in foetuses in a sheep [16] and in a cow [17] with diagnosis of neosporosis by isolation of the parasite and PCR, respectively.

The immunophenotype characterization of the inflammatory cells in the CNS of animals infected by *N. caninum*, has not been described. Therefore the objective of the present study is to characterize the inflammatory response and the glial cells at the CNS lesions in foetuses aborted by *N. caninum* and in healthy male goats naturally infected by the protozoan; besides, this is the first report of *N. caninum* cysts in the CNS of adult goats.

## **Materials and methods**

The experiment was conducted in the Veterinary Pathology Laboratory (Setor de Patologia Veterinária) at the Federal University of Lavras (UFLA) in the state of Minas Gerais, Brazil. This study was approved by the Ethics Committee of Animal Use (CEUA) from UFLA, under the protocol number 081/13.

### **Animals**

It was selected 14 goats in this study. Six were male goats and eight were foetuses naturally infected by *N. caninum*. In the male goats, congenital transmission was confirmed by identification of specific antibodies using

the indirect fluorescent antibody test (IFAT) at an initial serum dilution of 1:50, obtained from blood samples collected before the ingestion of colostrum and by *N. caninum* DNA detection by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced from CNS. The goats selected for this study were seronegative by IFAT to *Toxoplasma gondii*. The foetuses infection by *N. caninum* was also confirmed by DNA detection by PCR and sequenced from placenta and CNS, according to the methodology described by Mesquita et al. [12]. The adult animals were kept in pens. It was used, as negative controls, four foetuses and one adult male not infected by *N. caninum*.

### **Sample collection and processing**

The foetuses were necropsied shortly after abortion, and the adult males after euthanasia under anesthesia using thiopental and subsequent intravenous infusion with a potassium chlorate solution. Tissue samples from all the animals were collected in 10% neutral buffered formalin. The brain samples (cerebral cortex, thalamus, hippocampus, rostral and caudal colliculi, cerebellar peduncle, cerebellum, and obex) and spinal cord (cervical, thoracic, and lumbar) were routinely processed for histopathology and immunohistochemical testing (IHC). Samples of the cerebral cortex, thalamus, and cerebellum were also collected and stored at -20°C for PCR testing.

### **Immunohistochemistry**

To evaluate lesions and the cellular immunological response in the central nervous system, the following antibodies were used: anti-CD79 $\alpha$  (DAKO) for B lymphocytes; anti-CD3 (DAKO) for T lymphocytes; anti-GFAP (DAKO) for astrocytes; anti-G-H42a (Washington State University) for MHC-II molecules; and anti-PCNA (DAKO) for proliferating cell nuclear antigen, in dilutions of 1:2000, 1:50, 1:500, 1:1000, 1:500, and 1:1000, respectively. To confirm the presence of *N. caninum* in tissue slices, the antibody anti-*N. caninum* (VMRD) was used. Antigen retrieval for *N. caninum* and GFAP was done in a citrate buffer, pH 6.0, and for the other antibodies, a Tris-EDTA buffer was used; all slices were irradiated for 6 minutes at full power using a domestic microwave. Samples of CNS, lymph nodes, tonsils and tissues that contained the *N. caninum* were used as positive control. As a negative control, the antibody was substituted for phosphate-buffered saline. Additional brain sections were submitted to IHC using antibody anti-*T. gondii* (VMRD, Pullman Washington, USA).

### **Lectin histochemistry**

Biotinylated *Ricinus communis* agglutinin (RCA1, VECTOR), at a 1:1000 dilution (2 $\mu$ g/ml) and incubated overnight, was used to identify microglia and macrophages in the CNS samples. Antigen retrieval was done in a citrate buffer (pH 6.0), irradiated for 6 minutes at full power using a domestic microwave.

### **Molecular analysis**

Samples of the cerebral cortex, thalamus, and cerebellum were collected and stored at -20°C until analysis. DNA extraction was performed with a commercial kit (Wizard SV Genomic Purification System, Promega, Madison, USA) using lysis with proteinase K. For detection of *N. caninum*, the primers forward 5' -CTGTTAGAAGGTGCGGCGAA-3' and reverse 5' -TCTCTTGCTGCGGTGGAAAT-3' based on chromosome XII from *N. caninum* were used, as described by Orlando et al. [18], which amplify an expected fragment of 168 bp. PCR products were submitted to electrophoresis in 1% agarose gels at 100V for 1 h. The amplicons of the positive samples and the positive control were quantified by spectrophotometry and submitted to genetic sequencing using the dideoxy technique [18]

### **Results**

Tables 1 and 2 demonstrate the age of the animals and the stage in which abortion occurred, the presence and intensity of histopathological lesions, the method of diagnoses the *N. caninum* infection, and the intensity of the cells immunolabeling in the lesions. Foetuses 1, 2, 3, and 4 were the products of one single gestation. This was also the case with foetuses 5 and 6 and fetuses 7 and 8. Foetuses 2, 3, 9 and 10 and the male goat 7, negative for *N. caninum*, were used as negative controls. Goat 1 exhibited neurological symptoms at birth, with moderate paresis, lack of

coordination of the pelvic limbs and difficulty to standing up. These symptoms decreased a week after birth, and normal development proceeded until 12 months of age, when the animal was euthanized.

### **Necropsy and histopathology findings**

The goats did not exhibit macroscopic lesions. The microscopic findings in the foetuses were discrete to moderate perivascular mononuclear cuffs (foetuses 1, 4, 7 and 8) observed near the gliosis. The gliosis sometimes where focal and was observed in a decreasing frequency in the cerebral cortex (foetuses 5, 6 and 7), rostral colliculus (foetuses 4, 5 and 6), thalamus (foetuses 4, 7 and 8), caudal colliculus (foetuses 5 and 6), medulla oblongata and obex (foetuses 1 and 4) (Figure 1A), cerebellar peduncles (foetus 4), pons, cervical and lumbar spinal cord (foetus 8). Focuses of necrosis surrounded by glial cells and inflammatory cells were also observed in foetus 4 (cranial colliculus, pons, and thalamus) and foetus 8 (thalamus and lumbar spinal cord). Discrete mononuclear meningitis was observed in the cerebral cortex in foetuses 4, 5, and 6. *N. caninum* cysts were observed in the thalamus (foetuses 4, 5, 6 and 7) and in the cerebral cortex (foetuses 5, 6 and 7), related to the areas of inflammation (foetus 4) or not (foetuses 4, 5, 6, and 7). In foetus 7, a parasitic cyst was seen in the neuron cytoplasm, and in fetuses 5 and 6, there were rare foci of mineralization associated with necrosis.

The microscopic lesions in goats were gliosis (goats 1, 2, 3, and 4) (Figure 1B), perivascular mononuclear cuffs in the cerebral cortex (goats

1,2, and 3), obex (goats 1,3, and 4), thalamus (goats 1 and 3), pons, cerebellum, caudal and rostral colliculi (goat 3), and cervical, thoracic, and lumbar portions of the spinal cord (goat 3). Goat 6 exhibited discrete perivascular cuffs in the meninges. In the region of the cerebral cortex (goats 1 and 3), pons (goat 3), and obex (goat 4), giant multinucleated cells were associated to the focal inflammatory response (Figure 1C). *N. caninum* cysts were seen in the cerebral cortex (goats 2 and 3), rostral colliculus (goat 3), obex (goat 4), cervical, thoracic, and lumbar segments of the spinal cord (goat 3), and in the cytoplasm of neurons in the region of the obex (goat 4) (Figure 1D) and the cervical spinal cord (goat 3). No lesions were observed in the goat and foetus used as negative control.

### **Lectin-histochemistry**

The majority of cells within the areas of gliosis were positive for RCA1. The staining occurred in thalamus (foetuses 4, 6, 7, 8 and goat 1) (Figure 2A), cerebral cortex (foetuses 1, 4, 7 and goat 1 and 3), obex (foetus 1 and goat 4), cerebellum (foetus 4), pons (foetus 8 and goat 3), caudal colliculus (goat 3), and cervical (goat 3), thoracic (goat 3) and lumbar (foetus 8) segments of the spinal cord. The cells staining were also seen in perivascular cuffs in the cerebral cortex (foetuses 1, 4, 7 and goats 1 and 3), cerebellum, cerebellar peduncle (foetus 4), pons and caudal colliculus (goat 3) obex (goat 4), thalamus (foetuses 4 and 7), and in the lumbar spinal cord (foetus 8).

### **Immunohistochemistry**

*Neospora caninum*

Parasitic cysts and tachyzoites were IHQ labeled for anti-*N. caninum* antibody in fetuses 1, 4, 5, 6, and 7, and in parasitic cysts seen in youth and adults animals (goats 2, 3, and 4) (Figure 2B). The parasites were negative to *T. gondii* immunolabeling.

### GFAP

Anti-GFAP immunolabeling was intense in the astrocytes adjacent to the glial foci in the cerebral cortex near the white matter (foetus 1). The immunolabeling, also was present in the cells within glial foci in the cerebral cortex (foetuses 5 and 6), in the colliculi (foetus 4), and in an extensive area of gliosis in the cortex associated with a parasitic cyst (foetus 6). Foetus 8 exhibited a large quantity of astrocytes that labeled to GFAP that were surrounding glial foci in the lumbar spinal cord. In the adult goats, GFAP immunolabeling occurred in glial foci in the cerebral cortex (goats 1, 2 and 3) and in the thalamus (goat 1). The extended processes of immunolabeled astrocytes was scarce in foetuses 1, 4, and 5, and abundant in foetus 8, and in the goats 1 and 2 the astrocytic processes were numerous and more dense (Figure 2C).

### PCNA

It was observed anti-PCNA labeling in macrophages of the perivascular cuffs in the cerebral cortex (foetus 1, goats 1 and 3), thalamus (foetus 4), pons, caudal colliculus, and cerebellum (goat 3); and in the microglia of the glial foci in the cerebral cortex (foetus 1, goats 1 and 3), thalamus (foetus 4, goat 3), rostral colliculus, peduncle, cerebellum (foetus 4), and cervical spinal cord (goat 3)

### MHC-II

Immunolabeling occurred in the adult goats, in the cytoplasm of endothelial cells in the meningeal vessels (goats 1 and 6) and vessels from the cerebral parenchyma; in macrophages of the perivascular cuffs in the cerebral cortex (goats 1 and 3), obex (goat 4), pons, cervical spinal cord, cerebellum, thalamus and caudal colliculus (goat 3). Immunolabeling was also seen in the glial foci in the cerebral cortex (goats 1 and 3) (Figure 2D), obex (goat 4), and in the cervical spinal cord (goat 3). In the foetuses 7 and 8 there were MHC-II labeling in glial foci, endothelium and in the perivascular cuffs.

### CD3

It was observed rare T lymphocytes immunolabeled in the perivascular cuffs of the thalamus meninges in foetus 7 and in the perivascular cuffs and areas of gliosis in the thalamus of foetus 4. In the adult goats, the immunolabeling occurred in the perivascular cuffs in the cerebral cortex meninges (goat 6), in the thalamic parenchyma (goat 1), and in the cerebral cortex (goats 2, 3, and 5).

### CD79 $\alpha$

It was observed rare B lymphocytes immunolabeled in the perivascular cuffs and glial foci in the pons, cervical spinal cord, and thalamus in goat 3.



### **PCR and sequencing**

*N. caninum* DNA was detected by PCR from CNS samples of the fetuses (1,4,5,6,7, and 8) and from the goats (1,2,3,4,5 and 6) (Tables 1 and 2) and sequenced. The amino acid sequence showed homology with *N. caninum*.

### **Discussion**

The CNS is an immune privileged place, and the control of its immune responses is dependent on the relationship between various internal factors, since the blood-brain barrier restricts the migration of many cells and molecules of the immune system [19]. The gliosis and necrotic lesions as well as the mononuclear cell perivascular cuffs found in the aborted fetuses are compatible with those described in neosporosis [11, 13, 14, 15]. There is no description of gliosis and perivascular cuffs associated with the parasitic cysts of *N. caninum* in adult goats. Bishop et al. [16] described similar lesions in a sheep, with infection confirmed by PCR as well as the occurrence of protozoan tachyzoite-like structures in the vascular endothelium. There was, however, no report of cysts such as those found in the goats in this study. Sawada et al. [17] described gliosis and accentuated perivascular cuffs in a cow, with infection confirmed by isolating the agent in cell culture.

There were, in the goats of this study, giant multinucleated cells in the CNS, which were probably associated with the phagocytosis of parasitic structures. Similar findings in an aborted goat foetus were described by Corbellini et al. [10]. Several studies of *N. caninum* infection describe

perivascular cuffs, but do not make a phenotypical description of the cells in these lesions [11, 13, 14, 15]. In this study, lectin-histochemistry staining with RCA1 allowed the cells in the perivascular cuffs and the glial foci to be characterized as primarily of monocytic lineage, as described by Becher et al. [23]. Furthermore, anti-PCNA labelling suggested activation of the microglia resident in the CNS, and possible migration of blood monocytes, corresponding to the macrophages in the perivascular cuffs.

The GFAP antibody is the most important marker for astrocytes [20]. The astrocytes were labeled, in this study, in glial foci in fetuses and in adult goats, or astrocytes on the borders of the gliosis located in the transition areas between the gray matter and white matter in two foetuses.

These findings are characteristic of astrogliosis, showing the participation of astrocytes in *N. caninum* infection lesions, which was reinforced by the observation of an agglomeration of astrocytes related to a *N. caninum* cyst. These lesions suggest glial scarring, in which astrocytes attempt to isolate a focal lesion to guarantee local homeostasis in the CNS [21]. Drogemuller et al.[22] affirm that the activation of astrocytes in *Toxoplasma gondii* infections, along with the expression of a protein (gp130), is one important factor for infection resolution.

The expression of MHC-II molecules in the CNS was well-established in the adult goats and in one foetus. The presence of the parasite in the CNS was probably the trigger for the inflammatory response that stimulates the expression of MHC-II molecules by the endothelial cells and the

microglia activated in the CNS, probably mediated by IFN- $\gamma$ , in accordance with the theory proposed by Aloisi et al. [19]. These findings suggest that prevail a Th1 immune response against the parasite. Becher et al. [23] proposes that astrocytes activated in CNS lesions could emit MHC-II molecules, which was not shown in this study.

There were few B and T lymphocytes labeled in the lesions, in both fetuses and adult animals, which could be related to the incomplete activation of the lymphocytes in the CNS, probably culminating in their quick destruction through apoptosis [19].

This study demonstrated that in the caprine CNS occurred an accentuated expression of the MCH-II molecules in macrophages and microglia in the infection by *N. caninum*. This suggest a cell immunoresponse (Th1) against the parasite. Another important finding was the occurrence of encephalitis, sometimes accentuated and with focal granulomatous inflammation, associated or not to the parasitic cysts in the CNS of healthy adults goats.

#### **Conflicts of interest**

There are no conflicts of interest.

#### **Authors' contribution**

RCC led the work, the animals necropsies, the standardization of the IHC, as well as, the writing of the text as part of his master degree. DRO coordenated the standardization and realization of molecular analysis and

the critical analysis of the work. CCA assisted in samples collection and conducting the histopathology and IHC. KYRN. LCN. LPM, ACS, APP helped in the standartization of IHQ and molecular analysis as well as the review and critique of the work. PCM, DLR co-advisors of the student and critical reviewers of the work. MSV advisor of the student, coordinated the study and collaborator in the writing.

### **Acknowledgments**

The autors would like to thank FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) for its financial support, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for Master's Grant, and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for IC (Iniciação científica) grant.

### **5 Referências**

1. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A: **A Newly recognized fatal protozoan disease of dogs.** *J Am Vet Med Assoc* 1988, **193**:1269-1283.
2. McAllister, MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolly WR, Wills RA, McGuire AM: **Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*.** *Int J Parasitol* 1998, **28**: 1473-1478.

3. Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE: **Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum***. *Int J Parasitol* 2004, **34**:159-161.
4. King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA: **Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum***. *Int J Parasitol* 2010, **40**:945-950.
5. Dubey JP, Schares G: **Neosporosis in animals-The last five years**. *Vet Parasitol* 2011, **180**:90-108.
6. Dubey JP: **Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals**. *Korean J Parasitol* 2003, **41**:1-16.
7. Barr BC, Anderson ML, Woods LW, Dubey JP, Conrad PA: ***Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats**. *J Vet Diagn Invest* 1992, **4**:365-367.
8. Lindsay DS, Rippey NS, Powe TA, Sartin EA, Dubey JP, Blackburn BL: **Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pigmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum***. *Am J Vet Res* 1995, **56**:1176-1180.
9. Eleni C, Crotti S, Manuali E, Costarelli S, Filippini G, Moscati L, Magnino S: **Detection of *Neospora caninum* in na aborted goat foetus**. *Vet Parasitol* 2004, **123**:271-274.
10. Corbellini LG, Colodel EM, Driemeier D: **Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with**

degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *Vet Diagn Invest* 2001, **13**:416-419.

11. Varaschin MS, Hirsch C, Wouters F, Nakagaki KY, Guimarães AM, Santos DS, Bezerra PS Jr, Costa RC, Peconick AP, Langohr IM: **Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil.** *Korean J Parasitol* 2012, **50**: 63-67.

12. Mesquita LP, Nogueira CI, Costa RC, Orlando DR, Bruhn FRP, Lopes PFR, Nakagaki KYR, Peconick AP, Seixas JN, Bezerra Jr. OS, Raymundo DL, Varaschin MS: **Antibody Kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*.** *Vet Parasitol* 2013, **196**:327-333.

13. Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, Daft BM, Kinde H: **Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections.** *Vet Pathol* 1990, **27**:354-361.

14. Buxton D, Maley SW, Thomson KM, Trees AJ, Innes EA: **Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*.** *J Comp Pathol* 1997, **117**:1-16.

15. Morales E, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santacruz M: **Neosporosis in mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses.** *J Comp Pathol* 2001, **125**, 58-63.

16. Bishop S, King, J, Windsor P, Reichel MP, Ellis J, Slapeta J. **The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora***

***caninum* prevalence in sheep in New South Wales.** *Vet Parasitol* 2010, **170**:137-142.

17. Sawada M, Kondo H, Tomioka Y, Park CH, Morita T, Shimada A, Umemura T:**Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected cow.** *Vet Parasitol* 2000, **90**:247-252.

18. Orlando DR, Costa RC, Soares BA, Oliveira NSC, Nascimento LC, Peconick AP, Raymundo DL, Varaschin MS:**Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais.** *Pesq Vet Bras* 2013, **33**:1332-1338.

19. Aloisi F:**Immune Function of Microglia.** *Glia*2001, **36**:165-179.

20. Vandeveld M, Higgins RJ, Oevermann A: **General neuropathology.** In *Veterinary Neuropathology.* Edited by Vandeveld M, Higgins RJ, Oevermann A. Oxford: Wiley-Blackwell **2012**:1-37.

21. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS:**Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective.** *J Neuroinflammation*2004, **1**:1-14.

22. Drogemuller K, Helmuth U, Brunn A, Sakowicz-Burkiewicz M, Gutmann DH, Mueller W, Deckert M, Schluter D:**Astrocyte gp130 expression is critical for the control of *Toxoplasma* encephalitis.** *J Immunol*2008, **181**:2683-2693.

23. Becher B, Prat A, Antel JP:**Brain immune connection: immunoregulatory properties of CNS-resident cells.** *Glia* 2000, **29**:293-304.

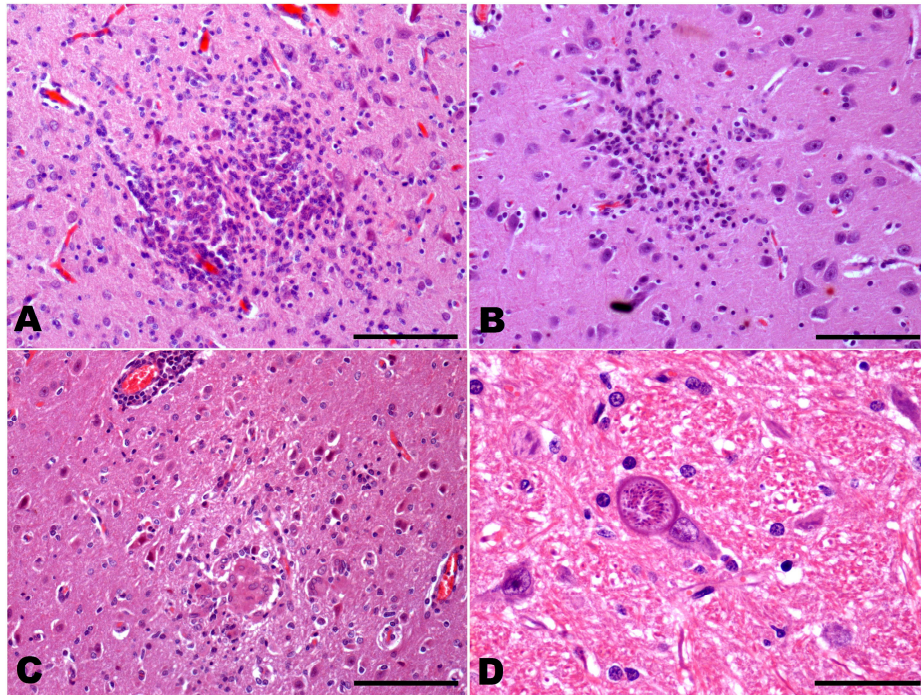
**Figures**

Figure 1: Neosporosis in goats, central nervous system lesions in naturally infected animals. H&E. A- Glial focus, cells with rounded and hyperchromatic nuclei in the brainstem (foetus 4), bar= 100 $\mu$ m. B- Gliosis in cerebral cortex, cells with rounded and hyperchromatic nuclei (goat 1), bar= 100 $\mu$ m. C- cerebral cortex near the cruciate sulcus, exhibiting giant cells and perivascular cuffs (goat 1), bar= 50 $\mu$ m. D- Obex. *N. caninum* cyst in the neuron cytoplasm (goat 4), bar= 50 $\mu$ m.



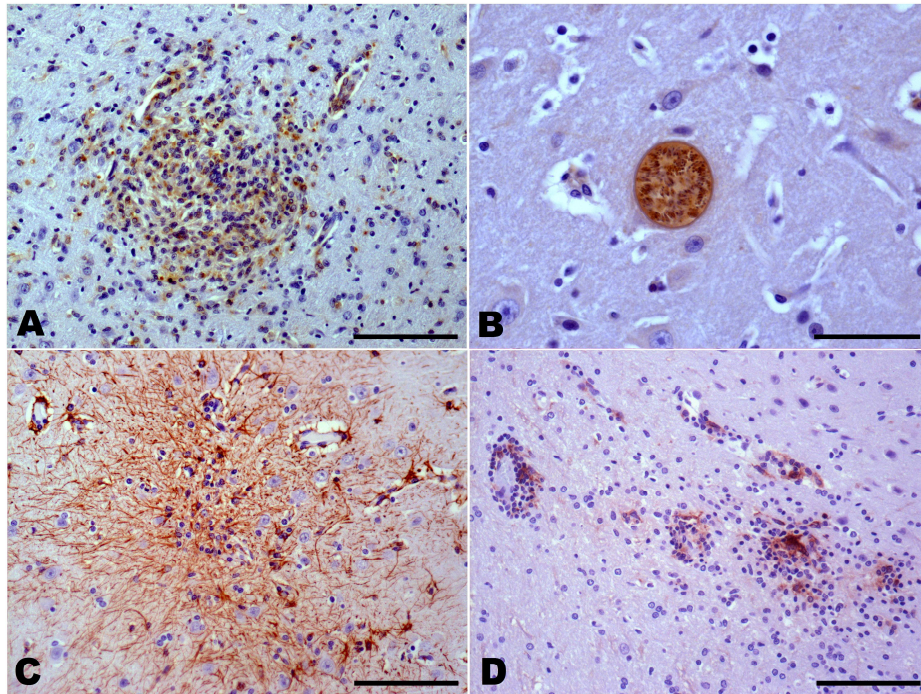


Figure 2: Neosporosis in goats, central nervous system lesions in naturally infected animals. A- Lectin-histochemistry staining (RCA1) revealed predominant microglia in a focus of gliosis, the same area shown in Figure 1A (foetus 4) (streptavidin-peroxidase method), bar= 100 $\mu$ m. B- Immunohistochemistry labeling for *N. caninum*, exhibiting a cyst in the central nervous system (goat 3) (biotin-streptavidin-peroxidase method), bar= 50 $\mu$ m. C- Immunolabeled for anti-GFAP in the glial focus shown in Figure 1B, (goat 1) (dual link system-HRP method), bar= 100 $\mu$ m. D- Cerebral cortex, anti-MHC-II immunolabeling in the perivascular cuff and adjacent gliosis (goat 1) (dual link system-HRP method), bar= 100 $\mu$ m.

Table 1: Neosporosis in goats, lesions, diagnosis and immunolabelling in fetuses.

Foetus	Age (days)	Lesions			Parasite confirmation			Immunolabelling					
		Gliosis	P. cuffs	Necrosis	PCR	HE	IHQ	RCA	GFAP	PCNA	MHC-II	CD3	CD79 $\alpha$
1	90	+++	+++		+			+++	+	+++			
2	90												
3	90												
4	90	+++	+++	+	+	+	+	+++	+	++			+
5	150	+			+	+	+		++				
6	150	+			+	+	+	++	++				
7	120	+	+		+	+	+	+			++		+
8	120	++	+	+	+			++	+		++		
9*	150												
10*	90												

Lesions graduation: discrete (+), moderate (++) and accentuated (+++). Immunohistochemistry labelling graduated by the number of cells in a field of 400x: less than 10 cells per field (+), 10 to 30 cells per field (+ +), more than 30 cells per field (+ + +). \* Negative Controls. P. cuffs (perivascular cuffs), HE (Hematoxylin and Eosin staining), PCR (Polimerase chain reaction), IHQ (Immunohistochemistry).

Table 2: Neosporosis in goats, lesions, diagnosis and immunolabelling in adult male goats.

Goat	age (months)	Lesions			Parasite confirmation			immunolabelling					
		gliosis	P. cuffs	G. cells	PCR	HE	IHQ	RCA	GFAP	PCNA	MHC-II	CD3	CD79 $\alpha$
1	12	+++	+++	+	+			+++	+++	+	+++	+	
2	6	+	+		+	+	+		+			+	
3	12	+++	+++	+	+	+	+	+++	+	++	++	++	+
4	12	+	++	+	+	+	+	++			++		
5	6		+		+							+	
6	36		+		+						+	+	
7*	10												

Lesions graduation: discrete (+), moderate (++) and accentuated (+++). Immunohistochemistry labelling graduated by the number of cells in a field of 400x: less than 10 cells per field (+), 10 to 30 cells per field (+ +), more than 30 cells per field (+ + +). \* Negative Control. P. cuffs (perivascular cuffs), G. cells (Giant cells), HE (Hematoxilin and Eosin staining), PCR (Polimerase chain reaction), IHQ (Immunohistochemistry).