

Detecção de ácidos nucleicos em tecidos de gerbils submetidos à infecção aguda por *Neospora caninum*

Detection of nucleic acids in tissues of gerbils submitted to acute infection with *Neospora caninum*

Gustavo Toscan^{I*} Giovana Camillo^I Augusto Weber^{III} Caroline Sobotyck de Oliveira^{II}
Paulo Bayard Dias Gonçalves^{III} Luis Antônio Sangioni^{II} Fernanda Silveira Flores Vogel^{II}

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário de grande importância na pecuária, por determinar problemas reprodutivos principalmente em bovinos. Os gerbils (*Meriones unguiculatus*) podem atuar como modelos experimentais para reproduzir a neosporose aguda de bovinos. Neste trabalho, foram formados dois grupos de gerbils (n=10), inoculados com taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1) nas doses de 5×10^6 taquizoítos ml^{-1} (G1) ou de 5×10^5 taquizoítos ml^{-1} (G2), doses capazes de induzir infecção aguda. Cérebro, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins e baço foram coletados e a técnica de PCR foi realizada a partir das amostras de tecidos e órgãos. Na maioria dos animais, o DNA do *N. caninum* foi detectado pelo menos em cinco tecidos, considerando ambos os grupos (12/20; 60%). No grupo 1, a frequência de detecção de DNA, na totalidade das amostras, foi maior (52/70; 74,28%) quando comparada ao grupo 2 (38/70; 54,28%). A partir desses resultados, pode-se afirmar que o protozoário replicou eficientemente após inoculação e se disseminou pelos tecidos. Além disso, demonstrou-se que gerbils podem ser utilizados como modelo de infecção aguda pelo *N. caninum*, apresentando sinais clínicos da neosporose.

Palavras-chave: *N. caninum*, infecção aguda, distribuição tecidual.

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan of great importance for livestock, mainly by causing reproductive diseases in cattle. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) may be a model to reproduce experimental acute neosporosis of cattle. In this study two groups of gerbils were formed (n=10) and gerbils were inoculated with *N. caninum* tachyzoites (NC-1 strain) at two different doses appropriate to cause acute

neosporosis: 5×10^6 tachyzoites ml^{-1} (G1) or 5×10^5 tachyzoites ml^{-1} (G2). Brain, spinal cord, heart, lung, liver, kidneys and spleen were collected and PCR was performed using samples of these tissues and organs. DNA of *N. caninum* was detected in at least five tissues for most animals (12/20; 60%) considering both groups. In group 1, the frequency of DNA detection, evaluating all samples, was higher (52/70; 74.28%) compared to group 2 (38/70; 54.28%). These results showed that the protozoan replicated efficiently after inoculation spreading by several tissues. Also, was demonstrated that gerbils can be used as model for acute infection with *N. caninum* showing clinical signs of neosporosis.

Key words: *N. caninum*, acute infections, tissue distribution.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo apicomplexa que apresenta distribuição mundial (ANDERSON et al., 2000). Esse agente é de grande importância na pecuária, uma vez que determina perdas econômicas consideráveis, devido principalmente aos problemas reprodutivos (ANDERSON et al., 2000). Cães domésticos (MCALLISTER et al., 1998) e coiotes (GONDIM et al., 2004) são descritos como hospedeiros definitivos desse agente. Estes animais excretam oocistos do protozoário nas fezes, que, após esporulados no meio ambiente, são ingeridos pelos hospedeiros

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: gugatoscan@hotmail.com. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Hospital Veterinário, Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (Biorep), CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

intermediários. Diferentes espécies de mamíferos assumem a condição de hospedeiros intermediários como: bovinos, equinos, felinos, ovinos, caprinos e cães (DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2005). Contudo, é nos bovinos que a infecção pelo *N. caninum* apresenta as maiores consequências, principalmente relacionadas à reprodução. No entanto, a principal forma de transmissão e manutenção do protozoário nos rebanhos é através da infecção vertical, no qual a vaca gestante transmite ao feto, uma vez que a maioria das infecções congênicas resulta no nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) (TREES & WILLIAMS, 2005).

Em bovinos, a infecção é caracterizada por perdas reprodutivas em fêmeas, podendo determinar diferentes consequências, sendo a morte embrionária durante o primeiro terço gestacional e abortos durante o segundo. No terço final da gestação, a infecção dificilmente acarreta em morte fetal e abortos, mas sim no nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI), o que também pode ocorrer no segundo terço gestacional (RAGHUPATHY, 1997; BIELSA et al., 2004). A resolução das consequências reprodutivas pela infecção do *N. caninum* serão basicamente determinadas pela relação entre o sistema imunológico do hospedeiro e a resposta do parasita (ENTRICAN, 2002). Na maioria dos animais, a infecção não é capaz de induzir imunidade protetiva, determinando uma condição de cronicidade em animais não prenhes, nos quais as consequências reprodutivas da infecção podem ocorrer repetidas vezes durante a vida dos animais infectados (MORALES et al., 2001; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2002; BIELSA et al., 2004). A escassez de dados a respeito da patogenia e métodos de controle dessa enfermidade faz com que sejam de grande valia estudos em relação a esses aspectos da infecção pelo protozoário.

Infecções agudas e crônicas pelo protozoário *N. caninum* em bovinos são, respectivamente, representados por duas diferentes fases evolutivas da doença, de taquizoítos e bradizoítos. As consequências clínicas destas duas fases diferem significativamente (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2009). Por essa razão, a determinação de regiões com maior probabilidade de receberem cistos teciduais contendo bradizoítos do protozoário, em tecidos bovinos infectados, torna-se uma ferramenta de fundamental importância para o diagnóstico e compreensão da patogênese da neosporose. No entanto, a utilização exclusiva de bovinos em estudos de patogenia é dispendiosa e demorada. Nesse sentido, diferentes espécies de animais de laboratório têm sido utilizadas como modelo experimental.

Os gerbils (*Meriones unguiculatus*) são os animais de laboratório utilizados como modelo experimental para mimetizar a infecção em bovinos, já que são considerados altamente sensíveis à replicação do protozoário e a neosporose aguda sem imunossupressão prévia (GONDIM et al., 2001). Essa característica foi demonstrada através da infecção com oocistos do protozoário *N. caninum* pela via oral, porém as observações encontradas em relação à patogenicidade dessa infecção podem ser variáveis (DUBEY & LINDSAY, 2000). Adicionalmente, CUDDON et al. (1992), GONDIM et al. (1999), GONDIM et al. (2001) revelaram que os gerbils são bastante sensíveis e respondem satisfatoriamente quando inoculados intraperitonealmente com taquizoítos de *N. caninum*.

Embora existam inúmeras pesquisas no que diz respeito ao *N. caninum*, há lacunas de indefinições que fundamentalmente necessitam de esclarecimentos, principalmente no que se refere ao ciclo e à patogenia do protozoário, para que possam ser determinadas alternativas estratégicas competentes para o controle e profilaxia da neosporose bovina. Nesse sentido, esta pesquisa objetivou: i. caracterizar a infecção aguda pelo *N. caninum* em modelos experimentais de roedores (*M. unguiculatus*) e ii. determinar quais os principais sítios de replicação do protozoário.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Fêmeas de *M. unguiculatus* (20 animais) com idade de seis semanas foram adquiridas e mantidas no biotério do setor de virologia, com condições de temperatura e umidade controladas, alimentação e água fornecidas *ad libitum* durante todo o período do experimento. Os roedores foram divididos em dois grupos, sendo cada grupo inoculado com doses diferentes contendo taquizoítos de *N. caninum* para caracterização da infecção aguda nessa espécie.

Preparação do antígeno

Para a obtenção do antígeno, taquizoítos da cepa Nc-1 de *N. caninum* foram inoculados em cultivo de células Vero para multiplicação. Os cultivos celulares foram mantidos e extraídos os taquizoítos, até alcançar concentração aproximada de 1×10^7 taq ml⁻¹ contados em câmaras de Neubauer. O inóculo foi preparado através da diluição dos taquizoítos para obtenção da concentração desejada.

Animais e inoculação

Os animais foram divididos em dois grupos contendo dez animais cada. Todos os roedores foram submetidos à inoculação pela via intraperitoneal de

inóculo contendo taquizoítos de *N. caninum* em duas diferentes concentrações *i*: grupo 1: dose de 5×10^6 taquizoítos ml^{-1} ; *ii*: grupo 2: dose de 5×10^5 taquizoítos ml^{-1} (RAMAMOORTHY et al., 2005).

Avaliação clínica

Os animais foram avaliados diariamente quanto à presença de sinais clínicos como: a inclinação lateral da cabeça, pêlos arrepiados, anorexia, aumento de volume abdominal, prostração, incoordenação motora, paralisia de membros e movimentos circulares (*Neosporose Cerebral*) (AGUADO-MARTÍNEZ, et al., 2009).

Coleta de tecidos

Os animais foram necropsiados e os tecidos avaliados macroscopicamente quanto ao aumento de volume, consistência e coloração. O líquido abdominal foi coletado e avaliado microscopicamente imediatamente no *post mortem*. Os seguintes tecidos foram coletados em um período de no máximo 12 horas *post mortem* ou após a eutanásia dos animais: cérebro, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins e baço. Todos os tecidos e órgãos foram lavados com solução salina fosfatada (PBS) no momento da coleta. O material foi acondicionado em tubos tipo eppendorf e armazenado à temperatura de -20°C até o seu processamento.

Extração de DNA

As amostras de tecidos foram pesadas e maceradas para a extração do DNA. O ácido nucleico foi extraído de 15 a 25mg de conteúdo, utilizando kit de extração com DNazol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme descrito pelo fabricante.

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de PCR foi realizada a partir das amostras de tecidos e órgãos, utilizando-se primers para uma sequência do gene NC5 do *N. caninum* (YAMAGE et al., 1996). A amplificação foi realizada de acordo com uma fase de desnaturação 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C , 1min; 60°C , 30seg; 70°C , 30seg; e uma extensão final de 70°C por 5 minutos. O produto final da amplificação da reação, com peso molecular de 328pb, foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. DNA extraído de cultivo de células Vero infectadas com taquizoítos de *N. caninum* foi utilizado como controle positivo e DNA extraído de células Vero não infectadas como controle negativo.

Análise estatística

Foi utilizado o teste Qui-Quadrado com nível de significância de 5% para comparação do total de

tecidos positivos entre os grupos e o teste de Fisher para a comparação da frequência de detecção de DNA entre tecidos nos dois grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão apresentados na tabela 1. Todos os animais, independente da dose inoculada, apresentaram sinais clínicos compatíveis com neosporose aguda. Os sinais clínicos observados foram de anorexia, redução na condição corporal, pêlos arrepiados e aumento de volume abdominal. Na necropsia, foi observada a presença marcante de exsudato fibrinoso no abdome. Os sinais clínicos foram mais precocemente observados e mais intensos nos animais do grupo 1, quando comparados ao grupo 2.

Nos animais do grupo 1, os sinais clínicos iniciaram 3 a 4 dias após a inoculação (p.i.) e persistiram por todo o período do experimento até a morte e/ou eutanásia dos roedores. A maioria dos animais (5/10) sofreu eutanásia *in extremis* ou morreram no dia cinco após inoculação. Três animais foram eutanasiados no dia 6p.i, um no dia 7p.i e outro no dia 8p.i (Tabela 1). No grupo 2, os sinais clínicos iniciaram nos dias 5 e 6 dias p.i. e persistiram até o 7º (5 animais) ou 8º (5 animais) dia, quando os animais foram eutanasiados. Ao exame macroscópico, os animais de ambos os grupos apresentavam volume de líquido do abdome entre 0,5 a 2ml por animal, com marcada presença de células inflamatórias e presença de taquizoítos dispersos no conteúdo abdominal. Rins, baço e fígado estavam aumentados de volume. Os dados observados no estudo são semelhantes aos observados por RAMAMOORTHY et al. (2005).

O DNA do *N. caninum* foi detectado em pelo menos cinco tecidos (12/20; 60%), em seis animais em quatro tecidos (6/20; 30%), em um animal em três tecidos (1/20; 5%) e somente em um animal foi detectado DNA apenas no rim (1/20; 5%). A partir desses resultados, pode-se afirmar que o protozoário replicou eficientemente após inoculação e se disseminou pelos tecidos e órgãos. Em relação à concentração inoculada, percebe-se que, nos animais do grupo 1, a frequência de detecção de DNA foi maior (52/70; 74,28%) quando comparada ao grupo 2 (38/70; 54,28%) (com nível de significância de 5%; $P=0,0135$).

Analisando-se os tecidos em separado, nos animais do grupo 1 (Tabela 1), em todos os animais, foi detectado DNA do protozoário no pulmão (10/10; 100%), em nove animais no coração (90%), no baço (90%) e rim (90%). No fígado, sete animais foram positivos (70%). De acordo com esses dados, fica

Tabela 1 - Detecção de ácidos nucleicos do *Neospora caninum* pela técnica de PCR em amostras de tecidos de gerbil (*Meriones unguiculatus*) submetidos infecção aguda com inoculação de 5×10^6 taq ml⁻¹ (Grupo 1) e 5×10^5 taq ml⁻¹ (Grupo 2).

Animais	Eutanásia ^o	-----Tecidos analisados-----							Total/ percentual
		Cérebro	Medula	Coração	Pulmão	Baço	Fígado	Rim	
-----GRUPO 1 (5×10^6 taq ml ⁻¹)-----									
1	5*	-	-	+	+	+	+	-	4/7; 57,2
2	6	-	+	+	+	+	+	+	6/7; 85,7
3	6	+	+	+	+	+	-	+	6/7; 85,7
4	6	-	+	+	+	+	+	+	6/7; 85,7
5	7	-	+	+	+	-	+	+	5/7; 71,4
6	5*	-	-	+	+	+	-	+	4/7; 57,2
7	5	+	-	+	+	+	+	+	6/7; 85,7
8	5	+	-	+	+	+	+	+	6/7; 85,7
9	5	+	-	+	+	+	+	+	6/7; 85,7
10	8*	-	-	-	+	+	-	+	4/7; 57,2
Total / percentual		4/10; 40%	4/10; 40%	9/10; 90%	10/10; 100%	9/10; 90%	7/10; 70%	9/10; 90%	
-----GRUPO 2 (5×10^5 taq ml ⁻¹)-----									
11	7	-	-	+	+	+	-	+	4/7; 57,2
12	7	-	-	+	+	+	+	+	5/7; 71,4
13	7	+	-	-	+	+	-	+	4/7; 57,2
14	7	-	-	+	+	-	+	+	4/7; 57,2
15	7	-	-	-	+	-	+	+	3/7; 42,8
16	8	-	-	+	-	+	+	+	4/7; 57,2
17	8	+	+	+	+	-	+	+	6/7; 85,7
18	8	+	-	+	+	+	-	-	4/7; 57,2
19	8	-	-	-	-	-	-	+	1/7; 14,3
20	8	-	+	-	-	+	-	+	3/7; 42,8
Total / percentual		3/10; 30%	2/10; 20%	6/10; 60%	7/10; 70%	6/10; 60%	5/10; 50%	9/10; 90%	

*Morte espontânea.

^oDias após-inoculação.

evidente que o protozoário, após a infecção inicial, apresenta ampla distribuição nos diferentes tecidos dos roedores. Assim, durante a infecção aguda, esses tecidos poderiam ser utilizados para pesquisa de proteínas, ácidos nucleicos ou ainda isolamento do protozoário. No sistema nervoso central, em 4 animais, foram detectados DNA através da reação de PCR. O mesmo resultado foi encontrado em relação à medula espinhal. Apenas no gerbil 3, DNA foi detectado tanto no cérebro como na medula. Esses dados reforçam que a infecção do SNC ocorre de forma mais tardia e é característico da infecção crônica (KANG et al., 2009).

Já os animais do grupo 2 (Tabela 1), em 90% dos animais, a reação de PCR foi positiva no rim. DNA do protozoário foi detectado em seis animais no coração e no baço (60%). No fígado, cinco animais foram positivos (50%) e sete gerbils foram positivos na reação de PCR no pulmão (70%). No cérebro e medula analisados, foram detectados ácidos nucleicos

específicos do *N. caninum* em três e dois animais, respectivamente. Apenas o gerbil 17 foi positivo para ambos os tecidos.

Os resultados da reação de PCR, quando analisados apenas os rins, a frequência de positivos nos dois grupos foi a mesma (9/10). A ocorrência de positividade de ácidos nucleicos foi maior em todos os tecidos dos animais do grupo 1, quando comparado com os tecidos dos gerbils do grupo 2. Para coração e baço do grupo 1, a frequência encontrada (9/10) foi mais elevada que os animais do grupo 2 (6/10). Para amostras de pulmão, a positividade no grupo 1 foi de 100%, no grupo 2, foi encontrada em apenas sete animais (70%). Esses dados corroboram os resultados encontrados por LOPEZ-PEREZ et al. (2006), que detectaram, no pulmão, taquizoítos de *N. caninum*, na fase aguda da infecção, e atribuíram esses elevados níveis encontrados nesse órgão à afinidade do agente ao tecido para replicação nos primeiros dias pós-

infecção, além de que esses valores reduzem com a evolução da enfermidade para um estágio crônico da doença. Com base nos resultados da infecção aguda em ambos os grupos, sugere-se que, em roedores, os tecidos que devem preferencialmente ser coletados para o diagnóstico são os rins, pulmão e baço, devido à frequência de detecção encontrados. Mais estudos precisam ser desenvolvidos para determinar essa relação em bovinos.

Embora os animais não tenham sido eutanasiados sequencialmente após a inoculação, no presente estudo, a tendência de invasão e distribuição tecidual do *N. caninum*, verificada pela frequência acumulada dos dois grupos foram rim>pulmão>baço=coração>fígado>cérebro>medula. Esses dados podem sugerir que a infecção inicial ocorre nos rins e pulmões e se distribuem pelos outros tecidos durante a infecção aguda e, mais tardiamente, formarão cistos especialmente no SNC.

Conforme KANG et al. (2009), o SNC é o local mais tardiamente invadido pelo parasita, o que pode justificar a menor frequência de detecção nesses tecidos em nosso estudo, embora o período de avaliação seja pequeno. Assim, os sinais clínicos encontrados nos animais durante o experimento foram decorrentes da infecção aguda e replicação em outros órgãos e tecidos. A evolução da infecção foi a morte dos animais ou eutanásia *in extremis*, não permitindo o desenvolvimento de infecção crônica/persistente, uma vez que a dose infectante administrada nos animais foi alta. Os resultados encontrados no cérebro e medula nos animais do grupo 1 (8/20; 40%) foram semelhantes aos do grupo 2 (5/20; 25%) (nível de significância; $P=0,3112$). Esse resultado é relevante, pois, independente das doses utilizadas no estudo, o protozoário invadiu o SNC. A infecção do SNC é de grande importância na epidemiologia da infecção, uma vez que este tecido atua como local de refúgio do parasita e é um importante sítio de privilégio do sistema imune (WILSON et al., 2010), além disso, é um dos locais onde o parasita forma cistos com bradizoítos e, dessa forma, o animal pode permanecer cronicamente infectado (NISIKAWA et al., 2001; COLLATES-FERNÁNDEZ et al., 2006). Outros trabalhos já detectaram DNA do protozoário no SNC a partir de modelos experimentais (COLLATES-FERNÁNDEZ et al., 2006; KANG et al., 2009). PEREIRA GARCÍA-MELO (2010), através da técnica de qRT-PCR, detectou ácidos nucleicos do protozoário utilizando diferentes cepas de *N. caninum* em camundongos da linhagem BALB/c. Na maioria das cepas, o DNA foi detectado no SNC substancialmente a partir do dia 8 após inoculação. No

entanto, para o isolado Nc-Sp 2H, o DNA do protozoário foi detectado no cérebro no primeiro dia após a inoculação. Diferenças na detecção de DNA do protozoário no SNC podem ocorrer dependendo da dosagem do inóculo utilizada, da cepa ou isolado, da espécie de roedor, da idade dos animais e também da sensibilidade do teste utilizado – (PCR/qRT-PCR). Além disso, NISIKAWA et al. (2001), COLLATES-FERNÁNDEZ et al. (2006), KANG et al. (2009), PEREIRA GARCÍA-MELO et al. (2010) reafirmam que esses tecidos são um sítio de localização dos protozoários na fase tardia da infecção, ou seja, fase crônica da neosporose.

Quanto à reprodução da infecção aguda em modelo experimental, camundongos apresentam lesão predominante identificada em exames histopatológicos, pneumonia linfocitocitária (LINDSAY & DUBEY, 1990). Comparando com o presente trabalho, pode-se perceber que o pulmão é também um importante sítio de replicação em gerbil (LINDSAY & DUBEY, 1990; LINDSAY, et al., 1995).

A utilização desses animais, como um instrumento de análise laboratorial, torna-se uma importante ferramenta para estudos de patogenia, testes de produção e proteção vacinal, diagnóstico da enfermidade, estudos no desenvolvimento de medicamentos eficazes para o controle e tratamento da enfermidade ou, ainda, para determinar virulência dos isolados de campo (ATKINSON et al., 1999, QUINN et al., 2002).

É importante estabelecer as melhores condições necessárias para reproduzir a enfermidade laboratorialmente. Para tal, o conhecimento do melhor modelo animal é fundamental para estabelecer essa situação. Essa condição é encontrada com os gerbils (*M. unguiculatus*), sendo considerada a espécie que melhor representa essas condições (GONDIM et al., 2001), ao passo que *Mus musculus* e camundongos da linhagem BALB/c dependem de imunossupressão prévia para reproduzir a doença.

Os gerbils assumem, nesse contexto, papel imprescindível no esclarecimento da patogenia desta enfermidade, determinada por inúmeras vantagens da sua utilização, a exemplo: possuir a capacidade de obter dados e resultados em curto período, ser um animal naturalmente sensível à infecção, produzir resposta imunológica e as manifestações clínicas da doença, fácil manipulação, apresentar custos baixos de execução, quando estas características são comparadas com demais hospedeiros. Os resultados obtidos nestes modelos animais devem ser correlacionados e mimetizar as características assumidas pelo *N. caninum* em hospedeiros intermediários, principalmente nos bovinos.

CONCLUSÃO

Com este trabalho, pode-se concluir que o *N. caninum* foi capaz de infectar e replicou eficientemente nos tecidos dos animais infectados. Além disso, a utilização desse modelo experimental, que demonstra sinais clínicos, não depende de imunossupressão prévia e é sensível à infecção aguda ao protozoário. É, sem dúvida, importante a sua utilização como ferramenta na pesquisa da patogenia e no desenvolvimento de vacinas contra o *N. caninum*.

COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Protocolo nº 92/2010.

REFERÊNCIAS

- AGUADO-MARTÍNEZ, A. et al. Stage-specific expression of NcSAG4 as a marker of chronic *Neospora caninum* infection in a mouse model. **Parasitology**, v.136, p.757-764, 2009. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=5661776>>. Acesso em: 20 fev. 2012. doi: 10.1017/S0031182009006076.
- ANDERSON, M.L. et al. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.417-431, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200001172>>. Acesso em: 15 nov. 2011. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00117-2.
- ATKINSON, R. et al. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.118, p.363-370, 1999. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=24393>>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- BIELSA, J.M. et al. Controle de neosporose em bovinos com Bovilis® Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.34-37, 2004.
- COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. et al. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**, v.142, p.187-191, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706003657>>. Acesso em: 13 jan. 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.05.030.
- CUDDON, P. et al. *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. **Journal Veterinary International Medicine**, v.6, p.325-332, 1992. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1992.tb00364.x>>. Acesso em: 09 jan. 2012. doi: 10.1111/j.1939-1676.1992.tb00364.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Research**, v.86, p.165-168, 2000. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/ukrxdyfv5qbr2x41>>. Acesso em: 13 fev. 2012. doi: 10.1007/s004360050027.
- DUBEY, J.P. et al. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal Parasitology**, v.32, p.99-105, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901003642>>. Acesso em: 07 jan. 2011. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00364-2.
- DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.21, p.473-483, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072005000344>>. Acesso em: 05 jan. 2012. doi: 10.1016/j.cvfa.2005.03.004.
- ENTRICAN, G. Immune control during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal Comparative Pathology**, v.126, p.79-94, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997501905390>>. Acesso em: 07 jan. 2011. doi: 10.1053/jcpa.2001.0539.
- GARCIA-VAZQUEZ, Z. et al. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.115-120, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702000407>>. Acesso em: 07 jan. 2012. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00040-7.
- GONDIM, L.F.P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, p.71-75, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401799001296>>. Acesso em: 07 jan. 2012. doi: 10.1016/S0304-4017(99)00129-6.
- GONDIM, L.F.P. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.1-7, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701004939>>. Acesso em: 07 jan. 2012. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00493-9.
- GONDIM, L.F.P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Journal Parasitology**, v.34, p.159-161, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751904000025>>. Acesso em: 08 jan. 2012. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.01.001.
- KANG, S.W. et al. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. **Parasitology Research**, v.104, p.1261-1268, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/x485862238vh6432>>. Acesso em: 08 jan. 2012. doi: 10.1007/s00436-008-1322-8.
- LINDSAY, D.S. et al. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. **Journal Parasitology**, v.81, p.313-315, 1995. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3283943>>. Acesso em: 08 jan. 2012.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **Journal Parasitology**, v.76, p.410-413, 1990. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3282676>>. Acesso em: 09 jan. 2012.
- LÓPEZ-PÉREZ, I.C. et al. Comparative effect of *Neospora caninum* infection in balb/c mice at three different gestation

- periods. **Journal Parasitology**, v.92, n.6 p.1286-1291, 2006. Disponível em: <<http://www.journalofparasitology.org/doi/abs/10.1645/GE-883R>>. Acesso em: 07 jan. 2012. doi: 10.1645/GE-883R.1.
- MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Journal Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751998001386>>. Acesso em: 07 jan. 2012. doi: 10.1016/S0020-7519(98)00138-6.
- MORALES, E. et al. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal Comparative Pathology**, v.125, p.58-63, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997501904773>>. Acesso em: 08 jan. 2012. doi: 10.1053/jcpa.2001.0477.
- NISHIKAWA, Y. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in Balb/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. **Vaccine**, v.19, p.1710-1716, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X00004072>>. Acesso em: 08 jan. 2012. doi: 10.1016/S0264-410X(00)00407-2.
- PEREIRA GARCIA-MELO, D. et al. Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. **Parasitology**, v.137, n.7, p.1057-1068, 2010. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=7788271>>. Acesso em: 08 jan. 2012. doi: 10.1017/S0031182009991855.
- QUINN H.E. et al. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. **Journal Parasitology**, v.88, p.691-696, 2002. Disponível em: <[http://www.journalofparasitology.org/doi/abs/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0691:COAOPM\]2.0.CO;2](http://www.journalofparasitology.org/doi/abs/10.1645/0022-3395(2002)088[0691:COAOPM]2.0.CO;2)>. Acesso em: 10 jan. 2012. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0691:COAOPM]2.0.CO;2.
- RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v.18, p.478-482, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167569997011274>>. Acesso em: 15 jan. 2012. doi: 10.1016/S0167-5699(97)01127-4.
- RAMAMOORTHY, S. et al. Gerbil model of acute neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.111-114, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704004364>>. Acesso em: 15 jan. 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.016.
- TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.21, p.558-561, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492205002795>>. Acesso em: 07 jan. 2012. doi: 10.1016/j.pt.2005.09.005.
- YAMAGE, M. et al. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction. **Journal Parasitology**, v.82, n.2, p.272-279, 1996. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3284160>>. Acesso em: 05 dez. 2012.
- WILSON, E.H. et al. Trafficking of immune cells in the central nervous system. **Journal Clinic Investigation**, v.120, n.5, p.1368-1379, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860945>>. Acesso em: 08 jan. 2012. doi: 10.1172/JCI41911.