



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS
ÓRGÃOS E SISTEMAS

MARIA SOCORRO GRANGEIRO

PAPEL DAS NEUROTROFINAS DURANTE A INFECÇÃO DE
CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL MURINO PELO
PARASITO *NEOSPORA CANINUM*

Salvador
2016

MARIA SOCORRO GRANGEIRO

**PAPEL DAS NEUROTROFINAS DURANTE A INFECÇÃO DE
CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL MURINO PELO
PARASITO *NEOSPORA CANINUM***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa

Salvador
2016

G758 Grangeiro, Maria Socorro.

Papel das Neurotrofinas durante a infecção de Células do Sistema Nervoso Central Murino pelo parasito *Neospora Caninum* / Maria Socorro Grangeiro. - Salvador, 2017.

58 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Dias Costa.

Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2017.

1. Neurociências. 2. Neuropatologia. 3. Sistema nervoso – central. I. Costa, Maria de Fátima Dias. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.8

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE TESE

MARIA SOCORRO GRANGEIRO

MECANISMOS MODULATÓRIOS DESENCADEADOS DURANTE A INFECÇÃO DE
CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELO PARASITO NEOSPORA
CANINUM

Salvador, Bahia, 16 de dezembro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA:



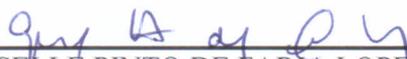
PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA DIAS COSTA (Orientador)



PROFA. DRA GYSELLE CHRYSTINA BACCAN (Examinador Interno)



PROFA. DRA REJANE CONCEIÇÃO SANTANA (Examinador Interno)



PROFA. DRA GISELLE PINTO DE FARIA LOPES (Examinador Externo)



PROF. DR. DIEGO MADUREIRA OLIVEIRA (Examinador Externo)

Aos meus filhos e ao meu esposo, pela compreensão, suporte e apoio que me ofereceram para sua execução.

Aos meus pais (*in memoriam*), pelo grande legado na prática de valores como o amor, a solidariedade, a honestidade, o respeito e a responsabilidade, imprescindíveis ao exercício da cidadania.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por me conceder a vida, força e coragem para a realização deste trabalho.

Aos meus pais (*in memoriam*), pelas lições que deixaram na minha formação como cidadã e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus filhos Alana Maria e José Anderson, ao meu esposo e também grande amigo José Gilberto Pinheiro, pelo companheirismo, compreensão, suporte e apoio.

A todos os membros, estudantes e funcionários do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular do Instituto de Ciências e Saúde, por quem tenho carinho especial. Amo a todos, sem exceção.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, que possibilitou a minha capacitação. Ao Coordenador Roberto Paulo Araújo e ao secretário Marcelo, pelo excelente desempenho, e a Célia, pela paciência em nos atender sempre.

À Professora Silvia Lima Costa, que me acolheu no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular e sempre me orientou.

Ao Professor Ramon dos Santos El-Bachá, pela ênfase nas suas colocações e orientações em todos os momentos que necessitei.

Ao Professor Victor Diógenes e à PhD Cleide Sousa Santos, por todas as orientações prestadas.

À Professora Elisabete Freire, que contribuiu sobremaneira no início deste trabalho com suas intervenções pertinentes e a excelente didática.

À Professora Dra. Maria de Fátima Dias Costa, minha orientadora, exemplo de profissional dedicada. Sou-lhe grata por ter acreditado no meu trabalho, aceitando-me como orientanda, e espero ter correspondido a sua expectativa.

*O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas.*

(Claude Lévi-Strauss)

GRANGEIRO, Maria Socorro. Papel das neurotrofinas durante a infecção de células do sistema nervoso central murino pelo parasito *Neospora caninum*. 58 f. il. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

RESUMO

No Sistema Nervoso Central (SNC), as células gliais são responsáveis por diversos papéis que garantem a homeostasia, incluindo a imunoproteção deste tecido. A glia responde a agressões teciduais por meio de intensas modificações morfofuncionais, conhecidas por gliose. O *Neospora caninum* (*Nc*), protozoário intracelular coccídeo, infecta várias espécies animais, possui tropismo especial pelo tecido nervoso e tem sido empregado como modelo de neuroinflamação, visando especialmente à análise de aspectos da interação glia-neurônio. Dados da literatura mostram que células gliais de ratos, quando infectados por taquizoítos de *Nc*, liberam a IL-10, que modula a resposta inflamatória, podendo participar do mecanismo de preservação do tecido nervoso. Estudos também apontam que parasitos, ao infectarem o tecido nervoso na tentativa de sobrevivência, induzem a liberação de fatores neurotróficos. O objetivo deste trabalho concentra-se em investigar a atividade modulatória das células gliais de ratos, infectadas com taquizoítos de *Nc*, na indução da diferenciação neuronal. A metodologia inclui a realização de culturas primárias de células gliais de ratos Wistar, nas condições controle, estimuladas com IFN- γ , infectadas com *Nc*, sensibilizadas com IFN- γ e infectadas com *Nc*. Os meios dessas culturas, condicionados pelos mencionados tratamentos, foram utilizados para cultivar neurônios, em co-culturas, por 24h. A seguir, foram observados os perfis fenotípicos astrocitários e neuronais marcados, respectivamente, com GFAP e β -III-tubulina, por imunocitoquímica. A atividade das desidrogenases mitocondriais, pelo ensaio de MTT e a expressão dos fatores neurotróficos NGF, BDNF, GDNF, NTF4 e do gene NTRK2, foram avaliados por qRT-PCR. A presença de nitrito foi avaliada nos sobrenadantes, utilizando um ensaio colorimétrico com base no método de Griess. Os resultados mostraram que a cultura primária apresentou astrogliose em todas as condições, quando comparadas ao controle. O aumento da atividade das desidrogenases mitocondriais foi observado na cultura infectada por *Nc*. Em relação aos fatores neurotróficos, a infecção com *Nc* induziu maior expressão de NGF e reduziu a expressão de BDNF. Por outro lado, na co-cultura, a reatividade astrocitária foi observada apenas nas amostras cultivadas no meio condicionado com IFN- γ . Ademais, houve aumento da atividade das desidrogenases no meio condicionado por *Nc*, em relação ao controle, assim como o aumento da expressão do gene NTRK2, observado em todos os grupos. Os dados permitem concluir que a infecção por *Nc* em células gliais induziu astrogliose, promoveu diferenciação neuronal e estimulou a expressão de NGF e NTRK2. Tais achados podem justificar a proteção neuronal, em proveito da manutenção da parasitose naquele ambiente.

Palavras-chave: Sistema nervoso central. *Neospora caninum*. Neuroglia. Neurotrofinas. Receptor NTRK2.

GRANGEIRO, Maria Socorro. *Role of neurotrophins during infection of murine central nervous system cells by the parasite Neospora caninum*. 58 pp. il. Thesis (Doctorate in Interactive Processes of Organs and Systems) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

ABSTRACT

Glial cells are responsible for several roles that guarantee homeostasis of the central nervous system (CNS), including its immunoprotection. Glia responds to tissue aggressions through intense morphofunctional modifications, known as gliosis. Neospora caninum (Nc), an intracellular protozoan, infects several animal species, and it has a special tropism for nervous tissue and has been used as a model of neuroinflammation, with particular focus on the analysis of glia-neuron interaction aspects. Literature data shows that glial cells from rats infected with Nc tachyzoites release IL-10, which modulates the inflammatory response and may participate in the preservation of nerve tissue mechanism. Studies also indicate that parasites, by infecting nervous tissue in an attempt to survive, induce the release of neurotrophic factors. The objective of the present study was to investigate the modulatory activity of glial cells of rats infected with Nc tachyzoites, in induction of neuronal differentiation. The methodology consisted on performing primary cultures of glial cell of Wistar rats, under conditions: control, stimulated by IFN- γ , infected by Nc, and under IFN- γ stimulation and Nc infection. Each medium conditioned by the respective treatment was used to cultivate neurons, in co-cultures, for 24 hours. Subsequently, were evaluated by immunocytochemistry astrocyte and neuronal phenotypic profiles, marked respectively with GFAP and β -III-tubulin. Mitochondrial dehydrogenases activity was also evaluated by MTT assay, while the expression of the neurotrophic factors NGF, BDNF, GDNF, NTF4 and the NTRK2 gene, were evaluated by qRT-PCR. The presence of nitrite was inspected in the supernatants using a colorimetric assay based on the Griess method. The results presented astrogliosis in the primary culture in all conditions, when compared to the control group. The increased mitochondrial dehydrogenases activity was observed in the culture infected by Nc. Regarding neurotrophic factors, the infection with Nc induced greater NGF expression and reduced BDNF expression. On the other hand, the co-cultures showed astrocytic reactivity only when treated with the IFN- γ conditioned medium. In addition, there was an increase in the dehydrogenase activity in the Nc conditioned medium, in comparison to control, as well as NTRK2 gene expression increment in all groups. This study data allows to conclude that Nc infection in glial cells induced astrogliosis, promoted neuronal differentiation and stimulated NGF and NTRK2 expressions. These findings may justify nervous system protection in favor of maintaining the parasitosis in neural environment.

Keywords: Central Nervous system. *Neospora caninum*. Neuroglia. Neurotrophins. Receptor NTRK2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	População celular do SNC	16
Figura 2	Vacúolo parasitóforo com <i>Nc</i> em astrócitos	19
Figura 3	Participação dos fatores neurotróficos na sobrevivência e diferenciação neuronal	21
Figura 4	Receptores neurotróficos da tirosina-cinase de baixa e alta afinidade	22
Figura 5	Linha do tempo de infecção da cultura de células gliais com <i>Nc</i>	28
Figura 6	Linha do tempo da cultura de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com <i>Nc</i>	29
Figura 7	Linha do tempo para obtenção de meio condicionado	30
Figura 8	Linha do tempo da co-cultura modulada com meio condicionado	31
Figura 9	Efeito da estimulação com IFN- γ e infecção com <i>N. caninum</i> sobre a atividade das desidrogenases mitocondriais em culturas de células gliais avaliado pelo teste do MTT	40
Figura 10	Análise da resposta astrocitária em culturas de células gliais estimuladas com IFN- γ e ou infectadas com <i>N. caninum</i> por meio da marcação imunocitoquímica para GFAP	41
Figura 11	Efeito do meio condicionado (MC) de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com <i>N. caninum</i> sobre a atividade das desidrogenases mitocondriais em co-culturas neurônios/glia avaliado pelo teste do MTT e coloração com Rosenfeld	42
Figura 12	Efeito do meio condicionado (MC) de células gliais estimuladas com IFN- γ infectadas com <i>N. caninum</i> sobre o fenótipo de astrócitos através da marcação imunocitoquímica para GFAP em co-culturas neurônios/glia	43
Figura 13	Efeito da infecção com <i>N. caninum</i> sobre a expressão de genes de fatores neurotróficos em culturas de glia avaliados por qRT-PCR	44
Figura 14	Efeito do meio condicionado (MC) de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com <i>N. caninum</i> sobre a produção de NO avaliado pela dosagem de nitrito em co-culturas neurônios/glia	44
Figura 15	Efeito do meio condicionado de <i>N. caninum</i> por meio da marcação imunocitoquímica em co-culturas neurônios/glia	45
Figura 16	Efeito da infecção com <i>N. caninum</i> sobre a expressão de genes de fatores neurotróficos em culturas de glia avaliados por qRT-PCR	46
Figura 17	Efeito do meio condicionado (MC) de células gliais estimuladas com IFN- γ infectadas com <i>N. caninum</i> e sobre a expressão gênica do receptor neurotrófico NTRK2 em co-culturas neurônios/glia	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorato
DMEM/F12	Meio Dulbecco modificado mistura de nutrientes F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócito
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Glia
GFAP	Proteína ácida do gliofilamento
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
MC	Meio condicionado
MC _c	Meio condicionado controle
MC _{IFN}	Meio Condicionado de cultura de células estimulada por IFN
MC _{IFN+Nc}	Meio condicionado de cultura de células gliais estimulada por IFN e infectada com <i>N. caninum</i>
MC _{Nc}	Meio condicionado de cultura de células gliais infectadas com <i>N. caninum</i>
<i>Nc</i>	<i>Neospora caninum</i>
NO	Óxido nítrico
NGF	Fator Neurotrófico Derivado de Nervo
NTF4	Neurotrofina 4
PGE2	Prostaglandina E2
PDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Parasito
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PLC α	Fosfolipase C
Ras-ERK	Sinal extracelular regulado por cinase

p75NTR	Receptor Neurotrófico p75
Th1	Resposta imune de células T auxiliares do tipo 1
Th2	Resposta imune de células T auxiliares do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TrkA	Receptor de tirosina cinase A
TrkB	Receptor de tirosina cinase B
TrkC	Receptor de tirosina cinase C
UI/MI	Unidades internacionais por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	JUSTIFICATIVA	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	16
3.2	RESPOSTA DAS CÉLULAS GLIAIS FRENTE À INFLAMAÇÃO E NEUROPROTEÇÃO	18
3.3	<i>NEOSPORA CANINUM</i> E A RESPOSTA NEUROINFLAMATÓRIA	19
3.4	CARACTERIZAÇÃO E PAPEL DAS NEUROTROFINAS	20
4	HIPÓTESE	25
5	OBJETIVOS	26
5.1	OBJETIVO GERAL	26
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
6	MATERIAL E MÉTODOS	27
6.1	CULTURA DE CÉLULAS GLIAIS	27
6.2	CULTURA DE <i>NEOSPORA CANINUM</i>	27
6.3	INFECÇÃO DE CÉLULAS GLIAIS COM <i>NEOSPORA CANINUM</i>	28
6.4	ESTÍMULO DE IFN- γ E INFECÇÃO DE CÉLULAS GLIAIS COM <i>NEOSPORA CANINUM</i>	28
6.5	OBTENÇÃO DE MEIO CONDICIONADO	29
6.6	CO-CULTURA GLIA-NEURÔNIO	30
6.7	COLORAÇÃO COM O CORANTE PANCRÔMICO ROSENFELD	31
6.8	TESTE COM MTT	31
6.9	MARCAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA	32
6.10	ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS	33
6.11	DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	34
6.12	EXTRAÇÃO DE RNA E QRT-PCR	35

6.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
7	RESULTADOS	36
7.1	EFEITO DA ESTIMULAÇÃO COM IFN- γ E/OU INFECÇÃO COM <i>NEOSPORA CANINUM</i> SOBRE A ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS EM CULTURAS DE CÉLULAS GLIAIS	36
7.2	ANÁLISE DA RESPOSTA ASTROCITÁRIA EM CULTURA DE CÉLULAS GLIAIS ESTIMULADAS COM IFN- γ E/OU INFECTADAS COM <i>NEOSPORA CANINUM</i>	36
7.3	EFEITO DO MC DE CÉLULAS GLIAIS ESTIMULADAS COM IFN- γ E/OU INFECTADAS COM <i>NEOSPORA CANINUM</i> SOBRE A ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS E MORFOLOGIA DE NEURÔNIOS EM CO-CULTURAS	37
7.4	EFEITO DO MC DE CÉLULAS ESTIMULADAS COM IFN- γ E/OU INFECTADAS COM <i>NEOSPORA CANINUM</i> SOBRE A REATIVIDADE ASTROCITÁRIA EM CO-CULTURAS	38
7.5	MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA GLIAL AO ESTÍMULO E/OU À INFECÇÃO COM <i>NEOSPORA CANINUM</i> : POSSÍVEL RELAÇÃO COM NEUROPROTEÇÃO E NEURITOGÊNESE	38
8	DISCUSSÃO	48
9	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	58

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum (*Nc*) é um protozoário intracelular obrigatório com capacidade de encistar-se no Sistema Nervoso Central (SNC). Pertencente ao filo Apicomplexa, é o principal agente etiológico da neosporose (DUBEY; SCHARES, 2011; REICHEL; ELLIS; DUBEY, 2007; WEBER et al., 2013; YAMANE et al., 1997). O parasito tem tropismo pelo tecido nervoso e há relatos de sua presença em cérebros de cães (DUBEY et al., 1988), de fetos abortados e de bezerros recém-nascidos (WILLIAMS et al., 2006), o que tem despertado especial interesse da Medicina Veterinária, por causar relevantes prejuízos econômicos na indústria agropecuária mundial (REICHEL, et al., 2013). Ademais, pesquisas recentes têm avaliado a resposta neuroinflamatória frente à infecção pelo *Neospora caninum*.

Modelos de estudo *in vitro*, bem como culturas de linhagens celulares de origem glial ou neuronal, são essenciais para a investigação da atividade biológica de compostos, mecanismos de resposta inflamatória frente à infecção por parasitos, a exemplo do *Nc* e têm sido amplamente utilizados para responder a mecanismos de infecção por esse parasito (DUBEY et al., 1998; McALLISTER et al., 1998).

Pinheiro et al. (2006, 2010) mostraram que as células gliais de ratos, quando infectadas por taquizoitos de *Nc*, liberam IL-10, modulando a resposta inflamatória no interesse de preservar o tecido nervoso. Santos et al. (2010) também observaram que culturas mistas da glia, estimuladas com glicoconjugados de *Nc*, induziam a liberação tanto de IL-10 quanto de TGF- β . Essas moléculas podem atuar sinergicamente, contribuindo para a manutenção da integridade tecidual. Por sua vez, Jesus et al. (2013) observaram, em culturas de células gliais de ratos infectados por taquizoitos de *Nc*, a participação da PGE₂ como colaboradora na modulação da resposta pró-inflamatória, cuja presença poderia evitar a destruição tecidual e garantir a integridade da rede neural. Além disso, Jesus et al. (2014) avaliaram co-culturas (glia-neurônio) estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Nc* e observaram liberação de IL-10, ausência de liberação de óxido nítrico (NO) e preservação neuronal.

Mecanismos imunomodulatórios já caracterizados pela literatura remetem à presença de fatores neurotróficos liberados pelo protozoário *T. cruzi* no Sistema Nervoso Central para promoção da integridade neural (CHUENKOVA; PEREIRAPERRIN, 2003). Fatores neurotróficos são polipeptídios que auxiliam no processo regenerativo. Constituem basicamente um conjunto de famílias de moléculas e de seus receptores responsáveis por manter o crescimento e a

sobrevivência dos axônios e neurônios após danos teciduais (SEBBEN et al., 2011). Em *T. cruzi*, tais fatores – a exemplo do fator neurotrófico derivado de parasito (PDNF) e do fator de crescimento do nervo (NGF) – já foram identificados e bem caracterizados (ARIDGIDES; SALVADOR; PEREIRAPERRIN, 2013; CHUENKOVA; PEREIRA PERRIN, 2010).

A liberação de fatores solúveis durante a infecção do tecido nervoso pelo *Nc* foi pouco descrita na literatura que estuda a resposta celular a esse protozoário. Essa consideração poderia explicar a modulação glial, desencadeada pela infecção, a qual resulta na indução da diferenciação neuronal. Este trabalho pretende investigar a atividade modulatória de células gliais de ratos infectadas por *Nc* por meio de fatores neurotróficos, os quais seriam responsáveis pela diferenciação neuronal e preservação tecidual.

2 JUSTIFICATIVA

A infecção de cultivos primários de células do tecido nervoso pelo *Neospora caninum* tem sido empregada como modelo de neuroinflamação, visando especialmente à análise da interação glia-neurônio.

Em um modelo de infecção bem estabelecido foi demonstrada a presença do vacúolo parasitóforo em astrócitos de ratos em cultura primária (PINHEIRO et al., 2006). Ainda, nessas células, foi caracterizado o perfil dessa resposta e a quantificação de óxido nítrico, TNF e IL-10, além de expressiva astrogliose (PINHEIRO et al., 2006, 2010). Também se cogitou que, por intermédio de mecanismo autócrino dependente da micróglia, poderia conter a inflamação em favor de uma possível proteção neuronal.

Para verificar essa provável proteção, foram posteriormente desenvolvidos experimentos em modelo de co-cultura. Os resultados demonstraram uma redução na carga parasitária nas culturas estimuladas com IFN- γ e LPS e inibição de NO nas culturas infectadas. A análise morfológica confirmou astrogliose, microgliose e preservação neuronal (JESUS et al., 2014).

Vários estudos mostram que nos meios de cultura condicionados por infecção de *T. gondii* e *T. cruzi* parece haver fatores solúveis produzidos pelos parasitos os quais inibem a formação de nitrito e a produção de citocinas, a exemplo de IL-1, IL-6, IL-10, TNF, TGF- β e IFN. Também são detectados fatores de crescimento como PDNF, NGF, GM-CSF e M-CSF (CHUENKOVA; PEREIRAPERRIN, 2010; ROZENFELD et al., 2003; SAWADA; SHIMOHAMA, 1999).

Ao encistar-se no tecido cerebral de seus hospedeiros, o *Nc* parece estabelecer interações em prol de sua defesa as quais podem estar associadas à cronicidade da infecção (INNES et al., 2000). O conjunto dos dados experimentais obtidos por meio da infecção de culturas primárias de células do SNC com taquizoítos de *Nc* leva ao questionamento sobre o papel da glia na modulação da resposta ao agente infeccioso, o que possivelmente previne a degeneração neuronal e induz neuritogênese.

Justifica-se a pesquisa dos fatores solúveis presentes em meio condicionado de células gliais sensibilizadas com IFN- γ e infectadas com *Nc*, para avançar na elucidação desses mecanismos imunomodulatórios no modelo de co-cultivo primário de neurônio-glia, tendo em vista que esses fatores, a exemplo de neurotrofinas,

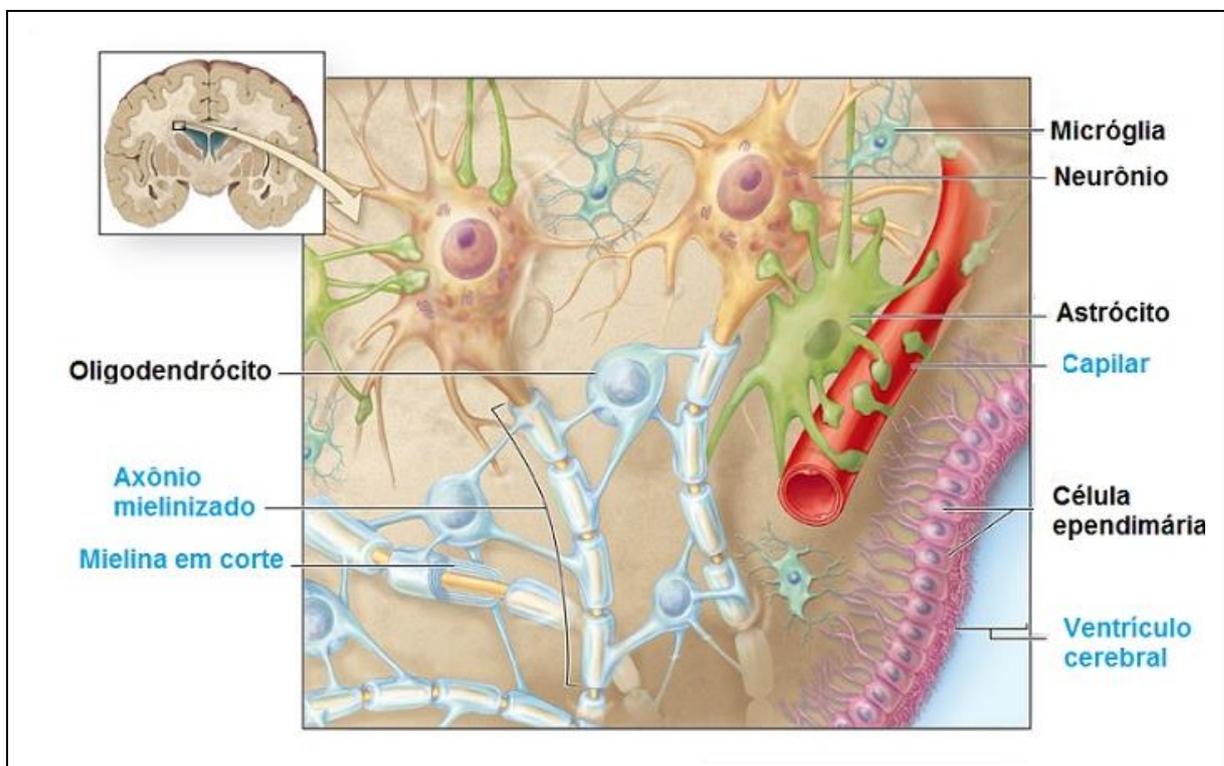
promovem a diferenciação e sobrevivência de neurônios e participam na modulação da transmissão e plasticidade sináptica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O Sistema Nervoso Central (SNC) é constituído histologicamente pelos neurônios e pelas células gliais. Estas últimas foram descritas pela primeira vez por Rudolf Virchow, em meados do século XIX, e por algum tempo lhes foram atribuídas apenas funções de suporte do cérebro. A glia é representada pela macróglia e micróglia (Figura 1).

Figura 1 – População celular do SNC



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

Para identificação da micróglia, o marcador específico mais utilizado é ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1), presente na membrana da célula (OHSAWA, 2004).

A macróglia é constituída por astrócitos, oligodendrócitos e endotélio. Astrócitos correspondem à metade das células do cérebro humano, sendo assim as mais abundantes do SNC. Apresentam fenótipos variados, a exemplo de astrócitos protoplasmáticos e fibrosos, presente nas substâncias cinzenta e branca,

respectivamente; e astrócitos velados, presentes no cerebelo (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

A multifuncionalidade dos astrócitos garante a homeostase cerebral. Entre as funções mais conhecidas, estão a criação da microarquitetura funcional e a formação da barreira hematoencefálica. Destaca-se também o seu papel na plasticidade sináptica, que envolve a liberação de neurotransmissores, controle do glutamato e regulação dos íons do meio extracelular. Ademais, oferecem suporte metabólico aos neurônios, promovendo neurogênese e crescimento axonal.

Atualmente, a identificação dessas células é feita por meio da expressão de uma proteína exclusiva do seu citoesqueleto, proteína ácida fibrilar da glia (GFAP). A intensidade da expressão de GFAP permite classificar os astrócitos quanto à sua morfologia. Distúrbios no Sistema Nervoso Central levam à alteração da morfologia glial. Essa reatividade astrocitária possui um efeito ambíguo, pois pode levar a uma neuroproteção ou perda sináptica e consequente morte neuronal.

Os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização dos axônios. As células endimárias revestem os ventrículos encefálicos, o canal medular e produzem o líquido cefalorraquidiano. Recentemente, células-tronco que expressam um antígeno de superfície celular conhecido por proteoglicano de condroitin-sulfato NG2 têm sido alvo de pesquisas, em virtude de apresentarem capacidade proliferativa e de participarem da modulação sináptica.

A micróglia possui origem mesodérmica e é semelhante, em estrutura e função, às células do sistema imune. Essa população celular é considerada macrófagos residentes e está intimamente associada ao desenvolvimento do sistema nervoso e da homeostase no adulto. Durante agressão ao sistema nervoso central, a micróglia migra para o local da lesão, modifica sua morfologia, prolifera e desempenha atividade fagocítica (KETTENMANN et al., 2011).

Assim, fenótipos ativos, ramificados e ameboides são encontrados em situações diversas de resposta a agressões. Além disso, a comunicação dessas células com os neurônios e linfócitos contribui para o estabelecimento, perpetuação ou resolução durante a doença (SHEMER et al., 2015).

3.2 RESPOSTA DAS CÉLULAS GLIAIS FRENTE À INFLAMAÇÃO E NEUROPROTEÇÃO

Durante uma agressão ao SNC, astrócitos e micróglia participam da resposta neuroinflamatória e desempenham funções essenciais para reparação, remodelação, angiogênese e recuperação axonal (BANATI et al., 1993; PINEAU; LACROIX, 2007). Essas células expressam receptores e liberam mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e neurotrofinas) que ativam vias de sinalização, no sentido de promover a preservação tecidual (JESUS et al., 2014; SPOHR et al., 2014; STRACK et al., 2002). Algumas citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF, TGF- β , IFN- α), e fatores de crescimento (GM-CSF e M-CSF) podem mediar efeitos neuroprotetores e/ou neurotóxicos (FARINA; ALOISI; MEINL, 2007; LIU et al., 2012; SAWADA; SHIMOHAMA, 1999) capazes de exercer funções benéficas ou prejudiciais aos neurônios após a ocorrência de danos teciduais no SNC.

A neuroinflamação é uma complexa resposta celular e molecular no SNC, que é deflagrada devido a uma condição de estresse, na tentativa de reparar o dano tecidual e eliminação do agente agressor. A ativação astrocitária provocada pela agressão pode ser caracterizada por proliferação e hipertrofia, com alargamento do corpo celular, denominada de astrogliose. A micróglia, por sua vez, durante processos patológicos, é capaz de mudar sua morfologia e adquirir uma variedade de funções, incluindo a fagocitose e secreção de mediadores pró-inflamatórios e fatores neurotóxicos (ESCARTIN; BONVENTO, 2008; LIU; TANG; FENG, 2011; ROSTWOROWSKI et al., 1997; ZHANG et al., 2010). Para além da capacidade de proliferar e de migrar ativamente para o local da agressão, essas células possuem a competência imunológica mais predominante no parênquima cerebral (FISCHER; REICHMAM, 2001).

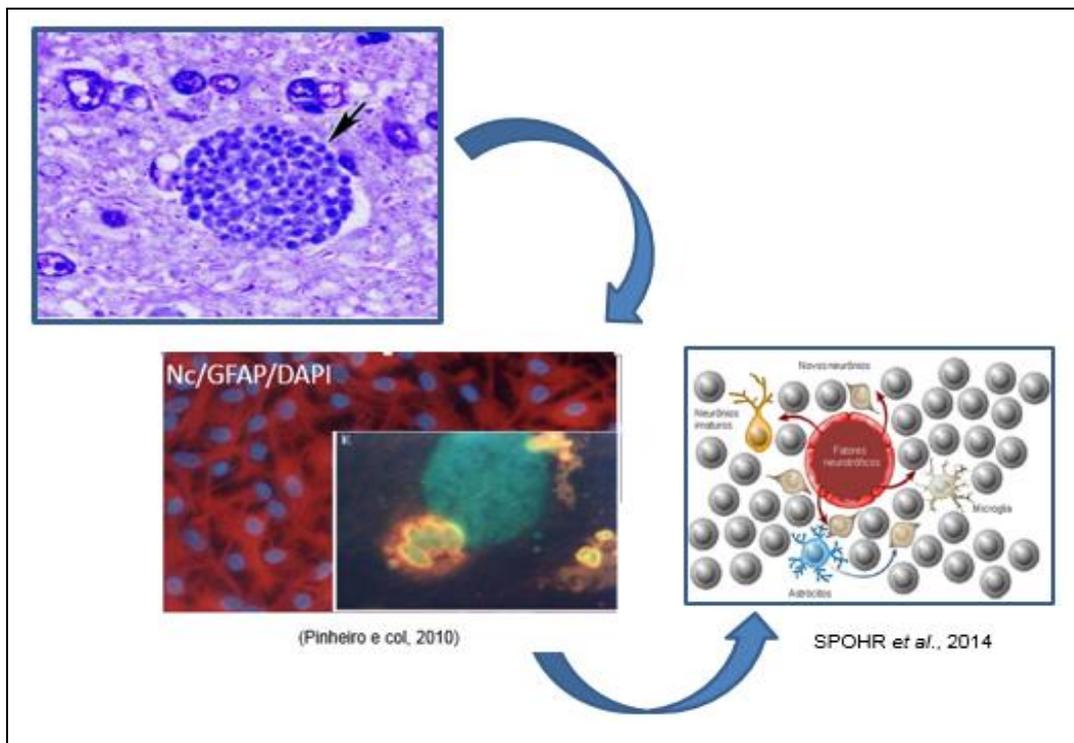
A morfologia da micróglia é dependente das funções exercidas, sendo que as três fases de desenvolvimento (ameboide, ramificada e ameboide com motilidade) refletem a plasticidade desse tipo celular. Além de alterações morfológicas, o aumento do número de receptores e a secreção de um grande número de produtos contribuem para defesa e, potencialmente para provocar dano cerebral (ROCK et al., 2004).

3.3 *NEOSPORA CANINUM* E A RESPOSTA NEUROINFLAMATÓRIA

Neospora caninum (*Nc*) é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, que possui tropismo por tecidos diversos, inclusive o tecido nervoso (DUBEY et al., 1998). Resultados recentes revelam que células dendríticas de camundongos infectadas por *Nc* resultam no aumento da carga parasitária em vários órgãos, como por exemplo, no Sistema Nervoso Central, em relação a infecções por parasitos livres (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000).

A transmissão do *Nc* ocorre via horizontal por meio de oocistos e cistos teciduais ou via vertical, do hospedeiro intermediário para o feto (McALLISTER et al., 1998). A neosporose desencadeia uma resposta humoral e celular, na qual anticorpos e citocinas pró-inflamatórias atuam em conjunto visando controlar a infecção (ANDRIANARIVO et al., 2005). Para caracterizar o papel da resposta imune glial nessa infecção, Pinheiro et al. (2006) propuseram um modelo *in vitro* de cultura primária de astrócitos corticais de ratos neonatos infectados com taquizoítos de *N. caninum* (Figura 2).

Figura 2 – Vacúolo parasitóforo com *Nc* em astrócitos



Fonte: Adaptado de Pinheiro et al. (2010) e Spohr et al. (2014).

Avaliações feitas com 24 e 72 horas após a infecção revelaram uma alta reatividade astrocitária com hipertrofia celular e reorganização do gliofilamento – quadro este caracterizado como astrogliose –, além da produção de óxido nítrico (determinada pela detecção de nitrito no meio de cultura) e liberação das citocinas TNF e IL-10, sem que fosse notada a produção de níveis significativos de IFN- γ . Na continuidade desses estudos, os mencionados autores propuseram avaliar mais precisamente a resposta conjunta de astrócitos e micróglia em culturas mistas desses dois tipos celulares.

Seguindo o modelo de avaliação com 24 e 72 horas após a infecção, os resultados observados confirmaram os achados anteriores, com a liberação de níveis significativos de NO, TNF, IL-10 e sem detecção de IFN- γ , sendo que nesse estudo destacou-se a produção de níveis elevados da citocina IL-6. Segundo os autores, a produção de altos níveis de IL-6 e IL-10 seria sugestivo de uma ação protetora glial no SNC, criando um ambiente imunologicamente privilegiado, enquanto que TNF e NO atuariam no controle da proliferação parasitária (PINHEIRO et al., 2010).

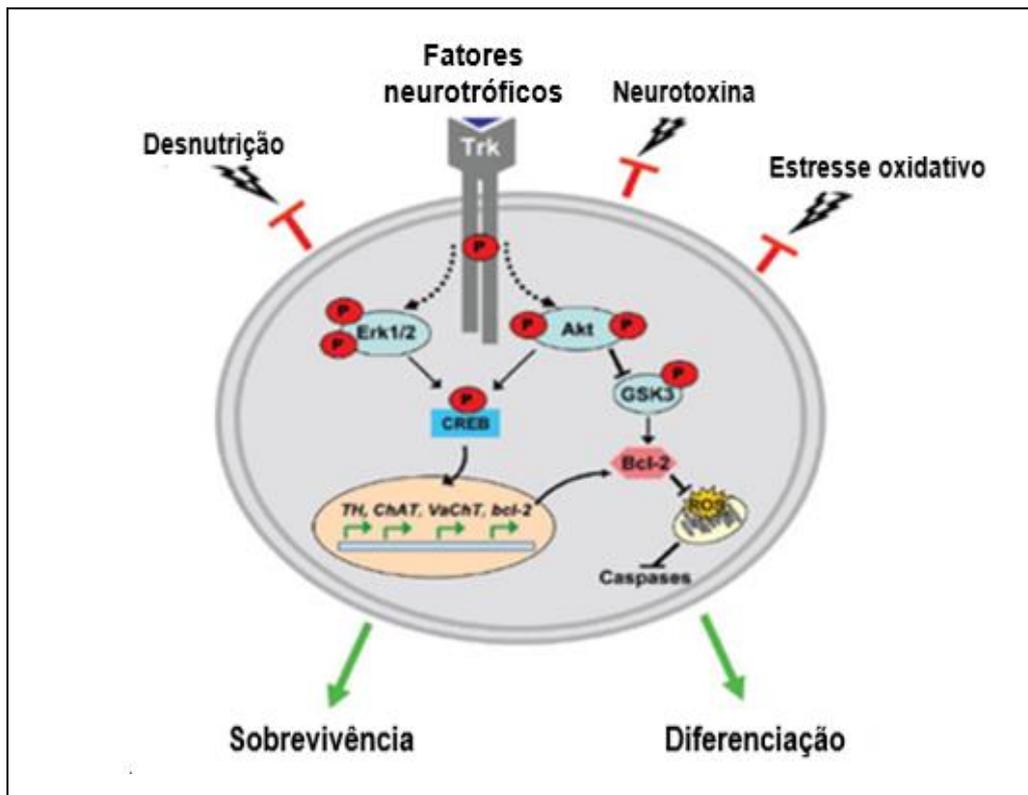
Jesus et al. (2013) observaram que em culturas de células gliais de ratos infectadas por taquizoítos de *Nc* havia a participação da PGE₂ como colaboradora na modulação da resposta pró-inflamatória, evitando destruição tecidual e garantindo a integridade da rede neural. Dando continuidade, Jesus et al. (2014) avaliaram coculturas (glia-neurônio) estimuladas com IFN- γ infectadas com *Nc* e observaram ausência de NO, liberação de IL-10 e preservação neuronal.

3.4 CARACTERIZAÇÃO E PAPEL DAS NEUROTROFINAS

As neurotrofinas são uma família de proteínas que promovem a diferenciação e sobrevivência de neurônios e participam na modulação da transmissão e plasticidade sináptica (**Figura 3**). Os mamíferos possuem quatro neurotrofinas – fator de crescimento do nervo ou *Nerve Growth Factor* (NGF), fator de crescimento derivado do cérebro ou *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina 4 (NT-4, também conhecido como NT-4/5), e usam três tipos de receptores tirosina-quinase: TrkA, TrkB e TrkC que são, respectivamente, codificados pelos genes NTRK1, NTRK2 e NTRK3 (**Figura 4**). Esses receptores podem colaborar

ou inibir ações uns dos outros para mediar os efeitos das neurotrofinas e, quando expressos, resultam na ativação de vias de transdução de sinal que induzem proliferação, diferenciação, desenvolvimento e sobrevivência de neurônios, que dependem do funcionamento e da interação dos sinais gerados por Trk (BOTHWELL, 2016; KAPLAN; MILLER, 2000).

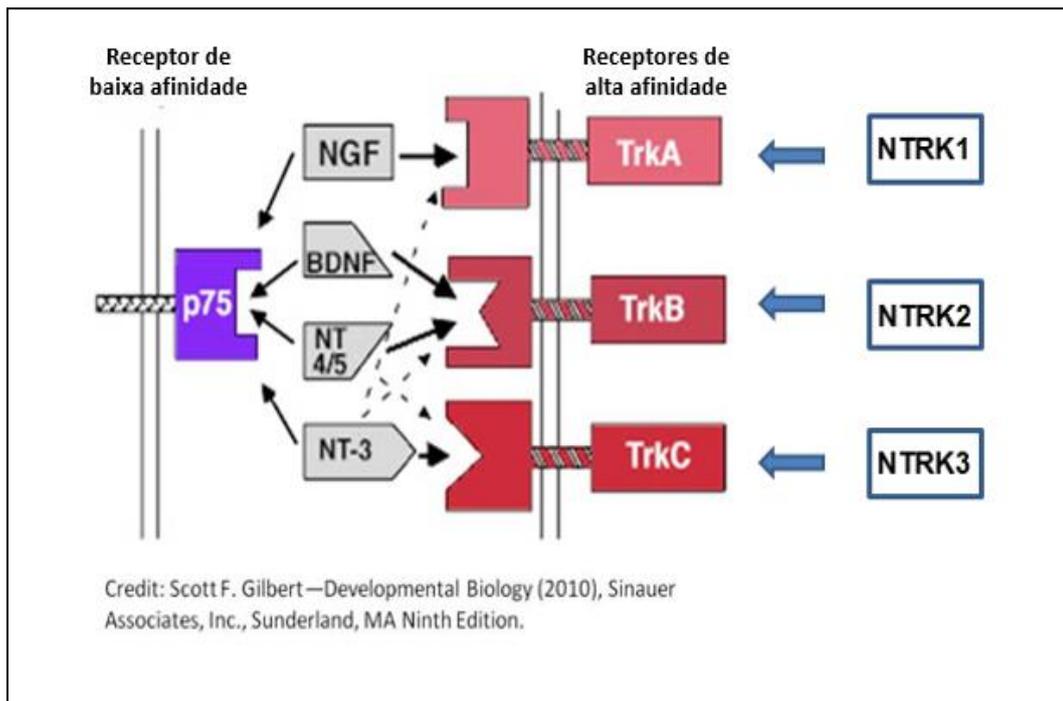
Figura 3 – Participação de fatores neurotróficos na sobrevivência e diferenciação neuronal



Fonte: Adaptado de Chuenkova e Pereiraperrin (2010).

Os receptores Trk têm como característica a presença de domínios tirosina-cinases, desencadeadores da transdução de sinais intracelulares. Sofrem dimerização induzida pelo ligante, ativando múltiplos sinais que promovem manutenção e sobrevivência neuronal, por meio da autofosforilação de domínios. (AMATU; SARTORE-BIANCHI; SIENA, 2016; BOTHWELL, 2006; WILSON, 2009).

Figura 4 – Receptores neurotróficos da tirosina-cinase de baixa e alta afinidade



Fonte: Adaptado de Scott (2010).

O receptor TrkA induz a ativação de fosfatidilinositol-3-cinase (IP3-K) e promove sobrevivência neuronal, enquanto que o TrkB pode desencadear vias distintas de sinalização, pela ativação de IP3-K ou cinase ativada por mitógeno (MAPK). Ainda pode ocorrer atuação de diferentes proteínas adaptadoras e fatores adicionais. O receptor p75 também pode ser visto como modulador, podendo alterar a especificidade da ligação dos receptores Trk. (AMATU; SARTORE-BIANCHI; SIENA, 2016).

O fator de crescimento do *Nerve Growth Factor* (NGF) é uma das neurotrofinas mais estudadas. Descoberto há mais de 50 anos, é caracterizado como uma molécula que desempenha um papel fundamental na regeneração de nervos, regulação da sobrevivência, proliferação e desenvolvimento de populações específicas de neurônios. Foi isolado, purificado e identificado como fator difusível, promotor de sobrevivência e crescimento de neuritos provenientes de neurônios simpáticos e sensitivos no experimento clássico de Rita Levi-Montalcini e Viktor Hamburger, em 1953 (ALOE, 2004; HALEGOUA; AMSTROUNG; CREMER, 1991).

NGF e BDNF possuem afinidade, respectivamente, para TrkA e TrkB, e não se ligam a TrkC. Este é reconhecido apenas por neurotrofina-3 (NT-3), que é a mais

promíscua das neurotrofinas, visto que se liga a TrkA e TrkB, embora com uma afinidade inferior (HUANG; REICHARDT, 2003; KURUVILLA et al., 2004).

A ligação de NGF ao seu receptor TrkA provoca a ativação das vias de sinalização de Ras e proteína cinase, ativada por mitógeno (MAPK), levando a uma maior proliferação e crescimento celular, por meio da sinalização extracelular, regulada por sinal ERK. Outras vias, como a fosfolipase C- γ (PLC γ) e PI3K, também são ativadas. (HUANG; REICHARDT, 2003; NAKAGAWARA, 2001).

As neurotrofinas desempenham uma ampla variedade de funções em tecidos neurais e não neurais, controlam o desenvolvimento embrionário, regulam o crescimento, a sobrevivência e a reparação do sistema nervoso. No processo de agressão, citocinas liberadas pelas células gliais parecem estimular uma regulação positiva desses fatores e de outros, como o *Glial Cell-derived Neurotrophic Factor* (GDNF), que por sua vez, são capazes de promover a sobrevivência neuronal (CHAO, 2003; REICHARDT, 2006).

Visto que os neurônios têm uma morfologia altamente polarizada, a sinalização que ocorre a partir de um fator neurotrófico alvo é transportada retrogradamente ao longo do axônio para o corpo celular. Um conjunto de provas sugere que o transporte retrógrado dos fatores neurotróficos e seus receptores exercem um papel chave na propagação do sinal para promoção do desenvolvimento e prevenção do dano neuronal (ITO; ENOMOTO, 2016).

O *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) atua na sobrevivência celular e induz transcrição de vários genes associados com a sobrevivência neuronal. Na síntese dessa proteína, o pré-pró BDNF é precursor do pró BDNF, que sofre clivagens proteolíticas, por enzimas como a furina ou pró-convertases, dando origem ao BDNF maduro (MOWLA et al., 2001).

O BDNF se liga ao receptor TrkB, com alta afinidade, e ao receptor p75NTR, com baixa afinidade. Os efeitos do BDNF são atribuídos à ativação do receptor TrkB, que transduz o sinal por meio da via Ras-ERK, PI3K e PLC γ , resultando em diferenciação e sobrevivência neuronal (HUANG; REICHARDT, 2001; MOWLA et al., 2001; ZAGAAR et al., 2013).

A neurotrofina-3 (NT-3) é um fator neurotrófico que estimula o crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses, atuando também na diferenciação de

neurônios já existentes. É encontrada, principalmente, em neurônios no Sistema Nervoso Central, mas é expressa também em músculos. Existem estudos os quais apontam que NT-3 estimula o crescimento de neuritos nos gânglios da raiz dorsal e, assim como BDNF, se liga ao receptor TrkB (AMATU; SARTORE-BIANCHI; SIENA, 2016; HUANG; REICHARDT, 2003).

A neurotrofina-4 (NT-4, também conhecida como NT-4/5) é uma proteína recentemente identificada com potenciais efeitos neurotróficos em algumas subpopulações de neurônios. Promove a sobrevivência de neurônios motores e sensoriais e se liga ao receptor TrkC. Esse acoplamento com NT-3 provoca ativação preferencial da via PI3 / AKT, prevenindo a apoptose e o aumento da sobrevivência celular (BOULLE et al., 2012).

4 HIPÓTESE

A motivação para a pesquisa parte do pressuposto de que os mecanismos modulatórios desencadeados por células gliais durante a infecção de células do Sistema Nervoso Central pelo parasito *Neospora caninum* induzem diferenciação neuronal.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade modulatória das células gliais de ratos infectadas com taquizoitos de *Neospora caninum* na indução da diferenciação neuronal.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade e morfologia de células gliais moduladas ou não com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum*.
- Avaliar a viabilidade e a morfologia celular de co-culturas de neurônios/glia estimuladas com meio condicionado obtido de cultivo de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum*.
- Identificar a presença de fatores neurotróficos: NGF, BDNF, GDNF e NTF4 em culturas de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum*.
- Detectar a expressão de receptores como NTRK2 para neurotrofinas em co-culturas de glia e neurônio cultivadas na presença de meio condicionado.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 CULTURA DE CÉLULAS GLIAIS

Foram utilizados ratos Wistar obtidos do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Todos os protocolos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), por meio do Parecer 041/2013.

Culturas primárias de células gliais foram obtidas a partir do córtex cerebral de ratos recém-nascidos (P0 a P48) da linhagem Wistar. Os hemisférios cerebrais foram removidos e as meninges foram retiradas. Em seguida o tecido foi dissociado mecanicamente em células individuais com o auxílio de pipeta de Pasteur e semeadas em lamínulas de vidro de 13mm (Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA), que foram colocadas em placas de 24 poços em uma densidade de 2×10^5 células por poço, previamente revestidas com poli-L-lisina ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$). (Sigma Chemical Co.) e em placas de 06 poços com uma densidade de 2×10^5 e em placas de 96 poços com uma densidade $3,3 \times 10^3$ (TP, trasadingen, Switzerland) em meio D-MEM/F-12 (SIGMA-ALDRICH®, EUA) e suplementado com 10% de SFB (Soro fetal Bovino), glicose (33 mM), glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (3 mM), penicilina (20UI/ml) e estreptomicina (20 g/mL) (GIBCO, EUA).

Todos os procedimentos foram efetuados em ambiente estéril. O cultivo foi realizado em uma estufa biológica a 37°C com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico até que as células atingissem a confluência ideal por um período de 18 dias. Após realização dos tratamentos, as amostras foram estocadas a -70°C , até o momento de realização dos testes de interesse. Todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen (Brasil). Esse protocolo resulta uma cultura de células gliais constituída por mais de 95% de células astrocitárias.

6.2 CULTURA DE *NEOSPORA CANINUM*

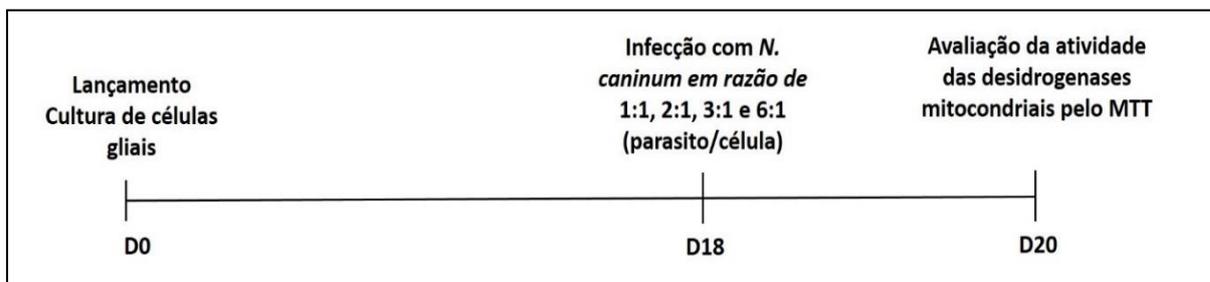
Taquizoitos da cepa de *Nc*, NC-1 (DUBEY et al., 1988) foram cultivados em monocamada de células VERO (fibroblastos renais de macaco verde africano) com meio RPMI 1640 suplementado com 5% soro fetal bovino (GIBCO) e com antibiótico penicilina (20UI/ml) estreptomicina ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) (GIBCO, EUA). As trocas regulares de

meio foram realizadas a cada 48 horas. Quando aproximadamente 90% das células estavam destruídas pelo efeito citopático causado pelo protozoário, a cultura foi então centrifugada a 4000xg a 37°C por 10 minutos e os taquizoítos presentes no pellet foram purificados em unidade filtrante com poro de 5µm (MILLIPORE, Brasil) (GONDIM et al., 2001). Posteriormente foram utilizados para a infecção das culturas de células gliais.

6.3 INFECÇÃO DE CÉLULAS GLIAIS COM *NEOSPORA CANINUM*

Culturas de células gliais foram infectadas com *Nc* para a avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais nas proporções: 1:1, 2:1, 3:1 e 6:1 (parasito/célula) por um período de 48 horas em placas de 96 poços com uma densidade de células de $3,3 \times 10^3$. As culturas foram cultivadas em meio D-MEM/F-12 suplementado e mantidas em condições ideais de cultivo, conforme descrito anteriormente. As amostras, após tratamento com MTT, foram mantidas por 24 horas em temperatura ambiente de 37°C até o momento da análise (**Figura 5**).

Figura 5 – Linha do tempo de infecção da cultura de células gliais com *Nc*



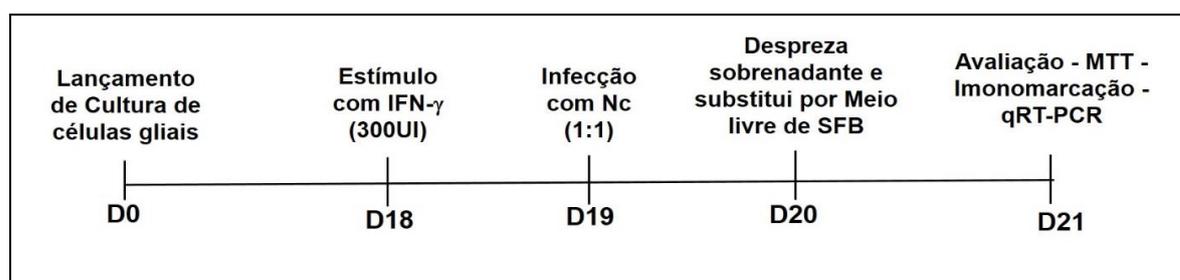
Fonte: Elaboração própria (2016).

6.4 ESTÍMULO COM IFN- γ E INFECÇÃO DE CÉLULAS GLIAIS COM *NEOSPORA CANINUM*

Culturas de células gliais foram estimuladas com IFN- γ a 300UI por 72h e infectadas com *Nc* nas proporções: 1:1 (parasito/célula). As células foram cultivadas em meio D-MEM/F-12 suplementado e, após infecção com *Nc*, o sobrenadante foi

desprezado e substituído por meio D-MEM/F-12 livre de soro e incubado por mais 24 horas, nas mesmas condições em que foi obtido o meio condicionado. As culturas de células gliais foram lançadas em placas de 96 poços, com uma densidade de células de $3,3 \times 10^3$ por 48 horas, para a avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais pelo MTT. Um novo lançamento foi realizado, sob as mesmas condições, em placas de 24 poços em uma densidade de 2×10^5 células por poço, previamente revestidas com poli-L-lisina ($10 \mu\text{g/ml}$) (Sigma Chemical Co.), para avaliação da morfologia celular por meio da imunomarcação por GFAP. Para avaliação por qRT-PCR, das culturas de células gliais (somente nas condições controle e infectada), as culturas foram lançadas em placas de 06 poços com uma densidade de 2×10^5 (TP, trasadingen, Switzerland) em meio D-MEM/F-12 (SIGMA-ALDRICH®, EUA). As culturas foram mantidas em condições ideais de cultivo, conforme descrito anteriormente, e as amostras, após tratamento com MTT, foram mantidas por 24 horas em temperatura ambiente de 37°C até o momento da análise. As células fixadas para imunomarcação foram mantidas a -20°C e as culturas tratadas com Trizol foram estocadas a -70°C para posterior análise (**Figura 6**).

Figura 6 – Linha do tempo da cultura de células gliais estimuladas com $\text{IFN-}\gamma$ e infectadas com *Nc*



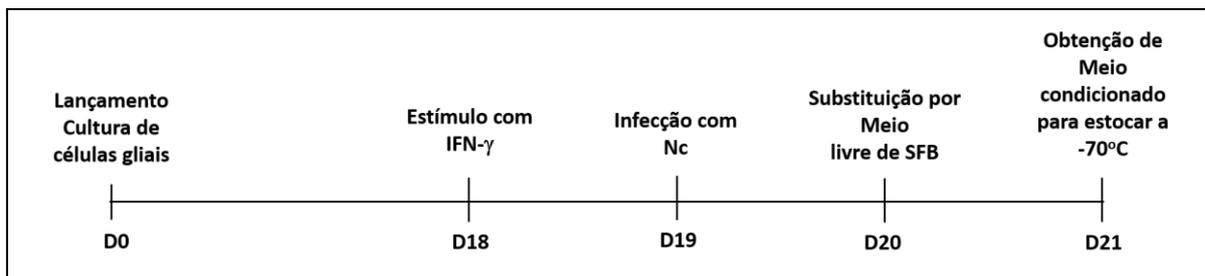
Fonte: Elaboração própria (2016).

6.5 OBTENÇÃO DE MEIO CONDICIONADO

Culturas de células gliais, cultivadas por um período de 18 dias, foram sensibilizadas com 300UI de Interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) por um período de 24 horas e infectadas com taquizoitos de *Nc* por uma razão de 1:1, por mais 24 horas. Em seguida, a monocamada foi lavada para remoção dos parasitos extracelulares e

mantida durante 24 horas em meio D-MEM/F-12 suplementado e livre de Soro Fetal Bovino (SFB). Decorrido esse tempo, o meio condicionado foi coletado, contendo fatores solúveis liberados pela glia, em quatro condições: controle; sensibilizada com IFN- γ ; infectada com *Nc*; sensibilizada com IFN- γ e infectada com *Nc*. O meio foi filtrado utilizando filtro de 0.22 μ m e estocado em freezer a -70°C para análise posterior (**Figura 7**).

Figura 7 – Linha do tempo para obtenção de meio condicionado



Fonte: Elaboração própria (2016).

6.6 CO-CULTURA GLIA-NEURÔNIOS

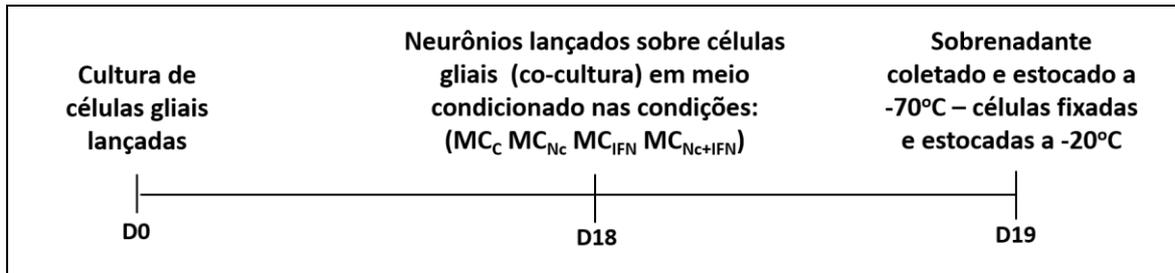
As células neurais foram obtidas de embriões de ratos da linhagem Wistar de ratas prenhes com 15 a 18 dias de gestação, após eutanásia por deslocamento cervical das ratas, e os embriões foram obtidos por cesariana. Os hemisférios cerebrais dos respectivos embriões foram removidos, as meninges retiradas e o tecido dissociado mecanicamente com o auxílio de pipeta Pasteur.

As células neurais foram semeadas sobre o tapete celular de células gliais confluentes em uma proporção de 1:2 (neurônios/astrocitos), em placas de 24 poços em uma densidade de 2×10^5 células por poço, previamente revestidas com poli-L-lisina (10 μ g/ml) (Sigma Chemical Co.) As culturas foram lançadas em placas de 06 poços com uma densidade de 2×10^5 (TP, trasadingen, Switzerland) em meio D-MEM/F-12 (SIGMA-ALDRICH®, EUA) e cultivadas em meio condicionado por um período de 24 horas em condições ideais de cultivo.

Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído e sacarose a 4% e imunomarcadas com GFAP e β -III-Tubulina ou tratadas com o reagente Trizol

para análise por qRT-PCR. As amostras imunomarcadas foram estocadas a -20°C e as tratadas com o reagente Trizol foram estocadas a -70°C , para análise posterior (**Figura 8**).

Figura 8 – Linha do tempo da co-cultura modulada com meio condicionado



Fonte: Elaboração própria (2016).

6.7 COLORAÇÃO COM O CORANTE PANCRÔMICO ROSENFELD

As co-culturas foram semeadas em lamínulas de vidro e em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (Cultilab, SP, Brasil), sendo cultivadas em meio condicionado de células gliais nas condições descritas anteriormente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS, fixadas e permeabilizadas com metanol a -20°C por 10 minutos. As células fixadas foram coradas, segundo protocolo estabelecido por Rosenfeld (1947). O reagente de Rosenfeld foi adicionado às placas contendo as células previamente tratadas em volume suficiente para cobrir completamente o tapete celular. Decorridos três minutos, foram adicionadas 20 gotas de água destilada à solução corante, deixando agir por 20 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com água corrente em pequeno fluxo, secas ao ar, analisadas por microscopia óptica (Nikon TS- 100) e fotografadas por uma câmara digital (Nikon E-4300).

6.8 TESTE COM MTT (AVALIAÇÃO DAS DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS)

O metabolismo celular foi avaliado por meio da atividade das desidrogenases mitocondriais, usando o método de conversão dos sais de metil tetrazolio MTT (3 Brometo de 4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio, um tetrazolio de coloração

amarela em cristais de formazam (coloração púrpura) (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989). A habilidade das desidrogenases mitocondriais em converter o MTT demonstra a integridade e atividade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, haja vista que isso ocorre somente quando a enzima redutase mitocondrial está ativa. Desse modo, culturas de células gliais nas condições descritas anteriormente e co-culturas moduladas com MC tiveram seus meios de culturas substituídos por 100 μ L/poço de MTT com a concentração final de 0,5 mg/mL diluído em D-MEM/F-12 (SIGMA-ALDRICH®, EUA). Essas culturas foram incubadas por 2 horas e, no final do período, adicionaram-se 100 μ L/poço de solução de solubilização, SDS 10%, por 24 horas, procedendo à leitura, posteriormente, em espectrofotômetro em comprimento de onda 540 nm.

6.9 MARCAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA

As culturas de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Nc* e as co-culturas expostas ao MC nas condições descritas anteriormente, após o tempo apropriado de infecção, modulação e cultivo com o MC nos diferentes estímulos, foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4 e fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% diluído em PBS, pH 7,2. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%) em PBS, por 15 minutos. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS por três vezes durante 5 minutos e, depois, os sítios de ligação não específicos foram bloqueados pela incubação com Soro Fetal Bovino (SFB) 5% em PBS (PBS-SFB 5%), por 30 minutos. A próxima etapa constituiu em incubar o material a ser marcado com o anticorpo primário, visando marcação do citoesqueleto de astrócitos e neurônios, respectivamente, por meio da expressão das proteínas GFAP e β -III-tubulina. Para a marcação do GFAP, foi utilizado anticorpo policlonal coelho anti-GFAP (DAKO, DINAMARCA) diluído 1:500 e o anticorpo secundário correspondente (anticorpo de cabra anti-coelho) conjugado com rodamina. A detecção de β -III-tubulina foi realizada pelo emprego do anticorpo primário monoclonal anti-tubulina (SIGMA) diluído 1:1000 e o secundário conjugado com FITC (1:1000). Os anticorpos foram diluídos em PBS-SFB 1% e a incubação foi feita em câmara úmida por 12 horas a 4°C. Posteriormente, as preparações foram lavadas com

PBS, incubadas com anticorpo secundário diluído em PBS-SFB 1%, por uma hora, à temperatura ambiente de 37°C.

Ao final do período de incubação, foram realizadas lavagens seguidas de incubação por 10 minutos, à temperatura ambiente de 37°C com DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol), intercalante de DNA que desenvolve cor azul. Logo após, foram feitas 3 lavagens consecutivas com PBS, acompanhadas de uma lavagem com água destilada. Por fim, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro em meio de montagem para imunofluorescência [n-propilgalato em glicerol 80% (Sigma-AldrichCo. St. Louis, MO)] e conservadas a -20°C, protegidas da luz, foram então observadas, sendo as imagens capturadas em microscópio de fluorescência Olympus® modelo AX70. Os experimentos foram realizados em triplicata, e cada resultado representa a média de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância.

6.10 ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS

Neurônios e astrócitos, após exposição ao meio condicionado, foram marcados com os anticorpos β -III-tubulina e GFAP, respectivamente. Em seguida, as imagens foram capturadas com a utilização do software Image-Pro Plus (Media Cybernetics). O tamanho dos prolongamentos celulares foi quantificado. Para isso, todos os neuritos presentes nas imagens analisadas foram medidos, com um mínimo de três imagens por condição, por cada experimento. Ao final, a média do tamanho dos neuritos foi obtida.

Para a obtenção do erro padrão, o mesmo experimento foi realizado três vezes. Para determinar a densidade celular, após estímulo com IFN- γ e infecção com *Nc* em cultura de células gliais e exposição ao meio condicionado, o número de astrócitos e neurônios foi quantificado por contagem de células coradas com DAPI em pelo menos cinco campos e 100 células por campo, escolhidos aleatoriamente. Para a quantificação da proporção de astrócitos GFAP positivos (GFAP+) com morfologia poligonal e multipolar (astrócitos reativos) foram contadas as células marcadas com GFAP e comparadas com o total de células coradas com DAPI. Os experimentos foram realizados em triplicata, escolhidos aleatoriamente cinco campos, e cada

resultado representa a média de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância.

6.11 DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Os níveis de nitrito foram avaliados nos sobrenadantes das co-culturas de neurônios/glia, os quais refletem a produção de NO, utilizando um ensaio colorimétrico com base no método de Griess. Co-culturas foram tratadas conforme descrito anteriormente. Alíquotas de 50 µL em triplicata foram misturadas ao meio de cultura com um volume igual de uma mistura 1: (v / v) de solução a 1% de sulfanilamida 1,0 e 0,1% naftiletilenodiaminadicloridrato em ácido fosfórico a 2,5%. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente de 37°C, a absorbância foi medida a 560 nm utilizando um microtitulação leitor de placas (BioTek Instruments, Inc., EUA). As concentrações de nitrito foram calculadas por comparação com uma curva de calibração padrão de nitrito de sódio (NaNO₂:1,26-100 mmol / L) com DMEM como controle de linha de base. Os dados foram expressos como percentagem da densidade óptica de culturas em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados em poços em triplicado para cada análise.

6.12 EXTRAÇÃO DE RNA E qRT-PCR

As co-culturas expostas ao MC de células gliais nas condições controle, infectadas, com e sem estimulação de IFN- γ , foram destinadas à extração de RNA utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Life Technologies) e Kit de isolamento (NucleoSpin RNAII, Macherey-Nagel Inc., Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

Após verificação da integridade e concentração de RNA total utilizando o auxílio do Nano Espectro KASVI (cat# K23-0002), a síntese do cDNA foi realizada com SuperScript® VILO™ Master Mix (Invitrogen, Life Technologies™). A técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) foi realizada por meio de Ensaios de Expressão Gênica Taqman® (Applied Biosystems, CA, USA) que contêm dois iniciadores para

amplificar a sequência de interesse e a sonda específica Taqman® MGB, marcada com o fluoróforo FAM e a com o TaqMan® Universal Master Mix II (Invitrogen, Life Technologies™), com vistas à identificação e à quantificação dos genes de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro), NT4 (Neurotrofina 4), NGF (Fator de Crescimento do Nervo) e GDNF (Fator Neurotrófico Derivado da Glia), além do gene do receptor neurotrófico de tirosina cinase tipo 2 (Receptor Neurotrófico de Tirosina Kinase 2, NTRK-2). Utilizou-se o instrumento ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, CA, USA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o instrumento QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). A termociclagem foi condicionada de acordo com as especificações do fabricante. Os genes de referência (controles endógenos) β -actina e HPRT1 foram utilizados para normalização dos dados de expressão gênica.

6.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada análise, foram realizados três experimentos independentes, cada um com amostragem em triplicata. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5.10 (Califórnia, EUA) e registrados como média \pm desvio padrão ou mediana \pm desvio padrão dos parâmetros avaliados. Para determinar a diferença estatística entre os grupos, foi realizada uma análise de variância por meio do teste One Way ANOVA seguida Kruskal-Wallis e pós test Dunns. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

7 RESULTADOS

7.1 EFEITO DA ESTIMULAÇÃO COM IFN- γ E/OU INFECÇÃO COM *NEOSPORA CANINUM* SOBRE A ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS EM CULTURAS DE CÉLULAS GLIAIS

O efeito sobre a atividade das desidrogenases mitocondriais nas culturas de glia infectadas com *N. caninum* (*Nc*) ou sensibilizadas com 300UI de IFN- γ foi investigado pelo teste do MTT. Inicialmente foi observado que a infecção com *Neospora caninum* (*Nc*), após 48 horas, aumenta significativamente a ação das desidrogenases mitocondriais na proporção de $10 \pm 1,2\%$, quando comparadas à condição controle (C), em cultura de células glias nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1 (parasito/célula hospedeira). Esse efeito é reduzido em $34 \pm 3,6\%$, quando as culturas são infectadas na proporção de 6:1, conforme demonstrado **Figura 9A** (vide seção 7.5).

Por outro lado, foi observada redução na atividade das desidrogenases mitocondriais, quando as culturas foram sensibilizadas com 300UI de IFN- γ , estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum*, conforme demonstrada na **Figura 9B** (vide seção 7.5). As culturas foram avaliadas com 72 horas de estímulo com IFN- γ e 48 horas de infecção com *Neospora caninum*.

7.2 ANÁLISE DA RESPOSTA ASTROCITÁRIA EM CULTURA DE CÉLULAS GLIAIS ESTIMULADAS COM IFN- γ E/OU INFECTADAS COM *NEOSPORA CANINUM*

Por meio da imunomarcção em cultura de células glias para proteína fibrilar ácida da glia (GFAP), a quantificação da proporção de astrócitos GFAP positiva (GFAP+) consideradas reativas (vide **Figura 10** na seção 7.5), conforme descrito anteriormente, mostrou que células glias infectadas com *Neospora caninum* com 48 horas reagem ao dano, apresentando moderada astrogliose, com uma média de $16 \pm 4,1\%$. Quando essas culturas não infectadas foram sensibilizadas com IFN- γ por 72 horas, observou-se aumento da astrogliose em uma média de $83 \pm 12\%$.

Por outro lado, quando essas culturas sensibilizadas com IFN- γ foram infectadas, houve redução da astrogliose em uma média de $32 \pm 9,2\%$, mostrando

que a infecção com *Neospora caninum* modula a resposta inflamatória, no sentido de promover a homeostasia.

7.3 EFEITO DO MC DE CÉLULAS GLIAIS ESTIMULADAS COM IFN- γ E/OU INFECTADAS COM *NEOSPORA CANINUM* SOBRE A ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS E MORFOLOGIA DE NEURÔNIOS EM CO-CULTURAS

Com o intuito de avaliar o efeito de meio condicionado (MC) de células glias estimuladas com IFN- γ por 72 horas e infectadas com *Nc* por 48 horas, sobre a ação das desidrogenases mitocondriais em co-culturas, foi realizado o teste do MTT (vide **Figura 11B** na seção 7.5) e a coloração com agente pancreático de Rosenfeld, para avaliar a morfologia (vide **Figura 11A** na seção 7.5). Essas avaliações foram efetuadas após 24 horas de exposição das co-culturas em meio condicionado. Foi observado que o tratamento das co-culturas com meio condicionado, proveniente de culturas de células glias infectadas com *Neospora caninum* (MC_{Nc}), induziu aumento significativo na atividade de desidrogenases mitocondriais com uma média de $30 \pm 1,6\%$, quando comparado com as co-culturas tratadas com meio condicionado em condições controle.

Entretanto, foi observada redução na atividade das desidrogenases mitocondriais com uma média de 20% nas co-culturas expostas ao meio condicionado, proveniente de culturas de células glias estimuladas com IFN- γ . Quando as co-culturas são expostas ao meio condicionado de culturas de células glias infectadas com *Neospora caninum* e tratadas com IFN- γ , esse efeito é semelhante ao grupo controle. A avaliação com o corante Rosenfeld mostrou diferenças morfológicas (crescimento neurítico e aumento de celularidade) do grupo em que a co-cultura foi exposta ao meio condicionado de células glias infectadas com *Neospora caninum*, em relação ao grupo controle e ao grupo estimulado com IFN- γ .

7.4 EFEITO DO MC DE CÉLULAS GLIAIS ESTIMULADAS COM IFN- γ E/OU INFECTADAS COM *NEOSPORA CANINUM* SOBRE A REATIVIDADE ASTROCITÁRIA EM CO-CULTURAS

A fim de avaliar o efeito de meio condicionado (MC) de células gliais estimuladas com IFN- γ e/ou infectadas com *Neospora caninum* sobre morfologia e viabilidade de astrócitos, as co-culturas de neurônios/glia foram analisadas após marcação por imunocitoquímica para a proteína GFAP (vide **Figura 12A**, seção 7.5). Não houve alteração na proporção de astrócitos GFAP+ poligonais nas co-culturas tratadas com meio condicionado proveniente de culturas de gliais infectadas com *Neospora caninum* (MC_{NC}). No entanto, o tratamento das culturas com meio condicionado de culturas de glia estimuladas com INF- γ (MC_{IFN}) induziu astrogliose com uma média de $25 \pm 3,1\%$ e com meio condicionado proveniente de culturas de glia infectadas com *Neospora caninum* e tratadas com INF γ (MC_{IFN+NC}), esse efeito foi reduzido.

Adicionalmente, para elucidar mecanismos envolvidos na resposta glial frente à infecção com *Neospora caninum*, foi analisado se o MC de células gliais, nas diferentes condições, regulava a produção de óxido nítrico (NO) (vide **Figura 13** na seção 7.5). Não foi observado aumento de NO nas co-culturas expostas ao meio condicionado proveniente de culturas de células gliais em relação ao grupo controle.

7.5 POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA GLIAL AO ESTÍMULO COM IFN- γ E/OU À INFECÇÃO COM *NEOSPORA CANINUM*: POSSÍVEL RELAÇÃO COM NEUROPROTEÇÃO E NEURITOGÊNESE

A fim de confirmar o efeito de meio condicionado (MC) de células gliais estimuladas com IFN- γ e/ou infectadas com *Neospora caninum*, sobre o crescimento de neuritos, as co-culturas de neurônios/glia, foram expostas ao MC por um período de 24 horas. As células neurais foram analisadas, após marcação por imunocitoquímica, para a proteína β -III-tubulina, marcador estrutural de neurônios, e o comprimento de neuritos foi determinado (**Figura 14**). Foi observado que o tratamento das co-culturas com meio condicionado, proveniente de cultura de células gliais infectadas com *Neospora caninum* (MC_{NC}), induziu aumento no número de células β -III-Tub+ (**Figura 14B**) e crescimento de neuritos (**Figuras 14A e 14C**) com

uma média de $27 \pm 6,4\%$, comparativamente com as co-culturas tratadas com meio condicionado em condições controle (MC_C).

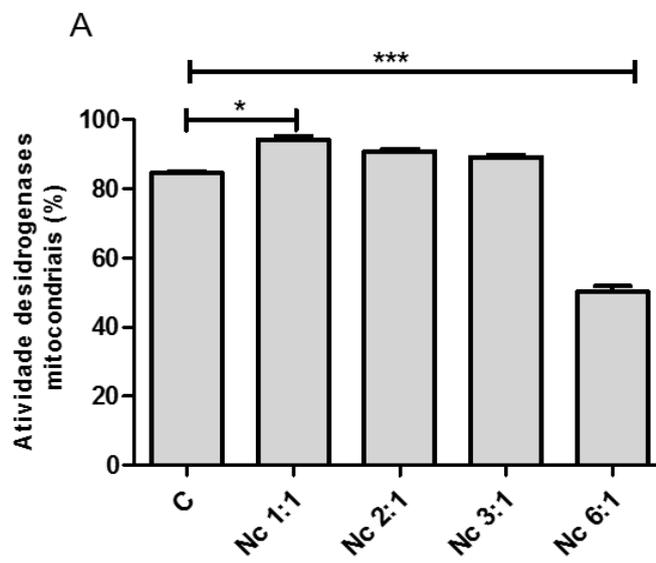
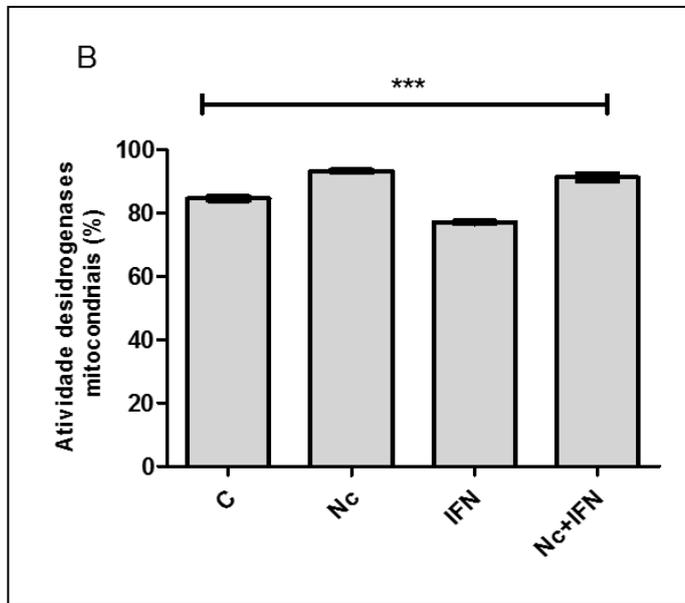
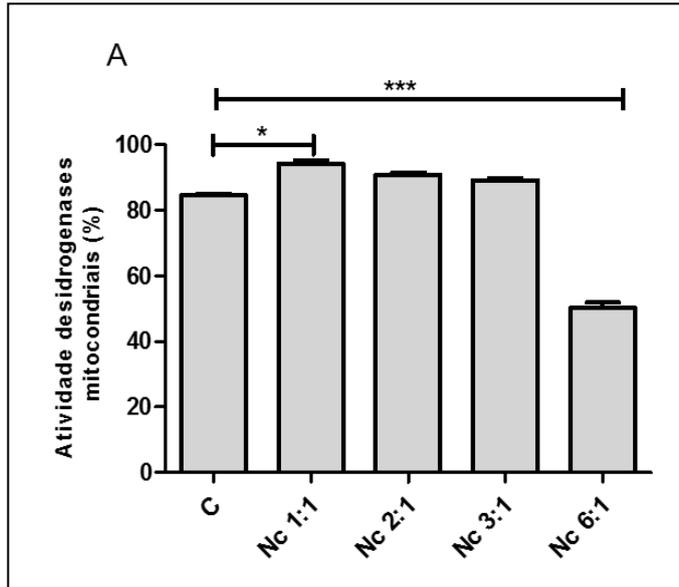
Já com o meio condicionado proveniente de culturas de células glias sensibilizadas com $INF-\gamma$ (MC_{IFN}), esse efeito é inibido. Entretanto, quando a co-cultura é exposta ao MC_{IFN+Nc} , o crescimento de neuritos não mostrou diferença estatística em relação ao controle (**Figura 14C**).

Com vistas a elucidar mecanismos envolvidos na resposta glial frente à infecção com *Neospora caninum* e possivelmente relacionados à neuroproteção e à neuritogênese, foi inicialmente investigada a expressão de genes de fatores neurotróficos GDNF, NGF, BDNF e NTF4 derivados das diferentes populações de células do SNC, nas culturas de células glias.

A análise por RT-qPCR mostrou que a infecção com *Neospora caninum* nas culturas de células glias não alterou expressão dos genes GDNF (**Figura 15A**) e NTF4 (**Figura 15B**), em relação ao grupo controle não infectado e apresentou redução significativa da expressão do gene BDNF (**Figura 15C**). Por outro lado, foi verificado aumento significativo da expressão do gene NGF (**Figura 15D**).

Foram então investigadas as co-culturas de glia/neurônios, cuja análise por qRT-PCR mostrou que a exposição das co-culturas ao meio condicionado de células glias infectadas com *Neospora caninum* (MC_{Nc}); com $INF-\gamma$ (MC_{IFN}) ou infectadas por *Neospora caninum* e estimuladas com $INF-\gamma$ (MC_{IFN+Nc}) induziram aumento da expressão do gene NTRK-2, quando comparado com as co-culturas tratadas com meio condicionado em condições controle (MC_C) (**Figura 16**).

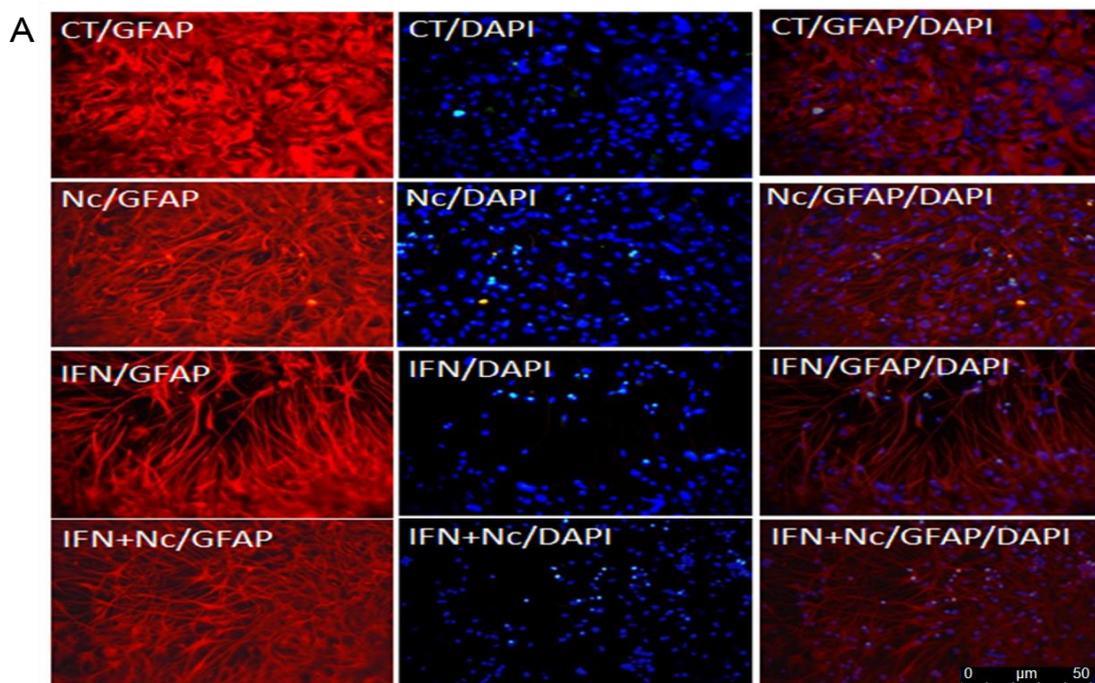
Figura 9 - Efeito da estimulação com $INF-\gamma$ e infecção com *Neospora caninum* sobre a atividade das desidrogenases mitocondriais em culturas de células glias avaliado pelo teste do MTT

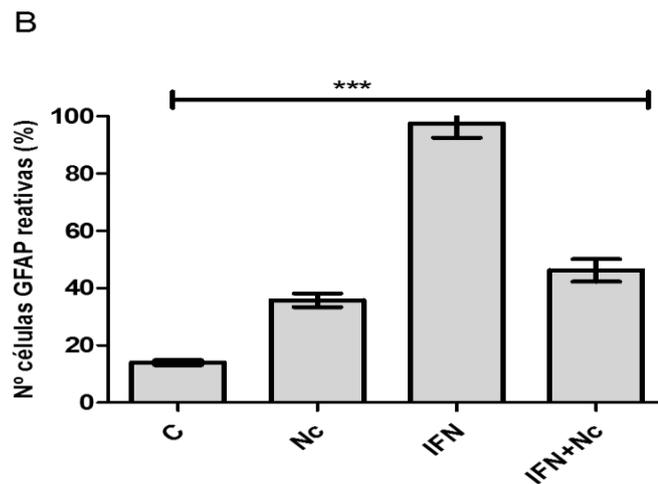


Fonte: Elaboração própria (2016).

Culturas de células gliais foram infectadas com *Neospora caninum* (Nc) nas proporções de 1:1, 2:1, 3:1 e 6:1 (parasito/célula hospedeira) e a avaliação foi determinada após 48 h. (**Figura 9A**). Cultura de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum* na proporção de 1:1 e avaliação foi determinada após 48 h. (**Figura 9B**). Condições: Controle (**C**) cultura de células gliais sem infecção e não tratadas; infectadas com *Neospora caninum* 1:1 (**Nc**), estimuladas com IFN- γ (**IFN- γ**); estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Nc* (**IFN+Nc**). Foram realizados três experimentos independentes e os dados avaliados estatisticamente pelo teste não paramétrico One-Way ANOVA seguido do Teste Kruskal-Wallis. (*) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo com valor de $P < 0.05$ (**), $P < 0,01$ e (***) $P < 0,001$.

Figura 10 - Análise da resposta astrocitária em culturas de células gliais estimuladas com IFN- γ e ou infectadas com *N Neospora caninum* por meio da marcação imunocitoquímica para GFAP

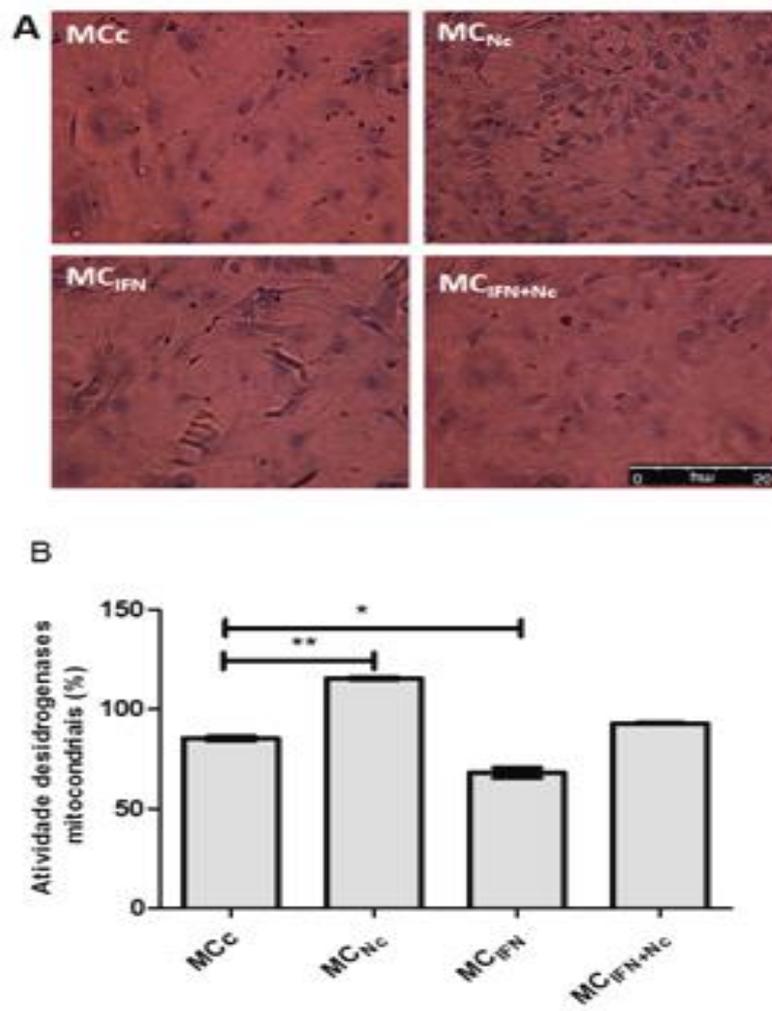




Fonte: Elaboração própria (2016).

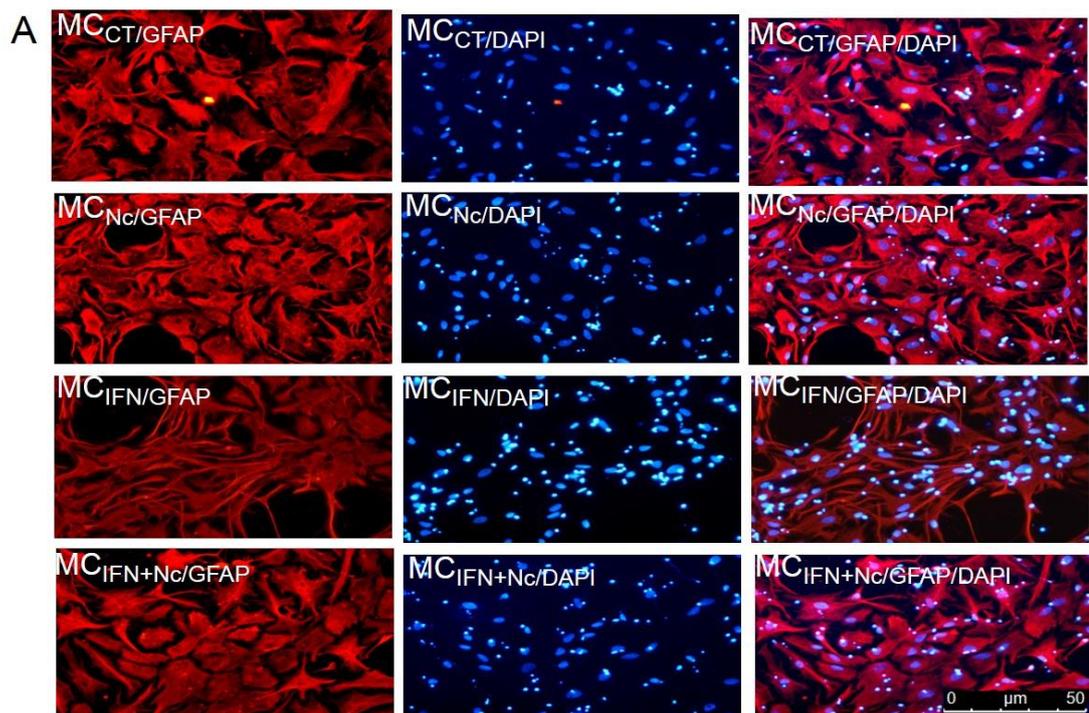
Culturas de células glias cultivadas nas condições: controle (**C**): células glias não tratadas; infectadas com *N. caninum* na proporção 1:1 (**Nc**), estimuladas com IFN- γ (**IFN**); estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Nc* (**IFN+Nc**). Fig. A – Imunomarcção para a proteína GFAP. Fig. B – Número de células GFAP reativas. Foram realizados três experimentos independentes e os dados avaliados estatisticamente pelo teste não paramétrico One-Way ANOVA seguido do Teste Kruskal-Wallis e do Pós-Teste Dunn's. (*) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo com valor de $P < 0.05$. (**) $P < 0,01$ e (***) $P < 0,001$.

Figura 11- Efeito do meio condicionado (MC) de células glias estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum* sobre a atividade das desidrogenases mitocondriais em co-culturas neurônios/glia avaliado pelo teste do MTT e coloração com Rosenfeld



Fonte: Elaboração própria (2016)

Figura 12 - Efeito do meio condicionado (MC) de células gliais estimuladas com IFN- γ infectadas com *N. caninum* sobre o fenótipo de astrócitos através da marcação imunocitoquímica para GFAP em co-culturas neurônios/glia

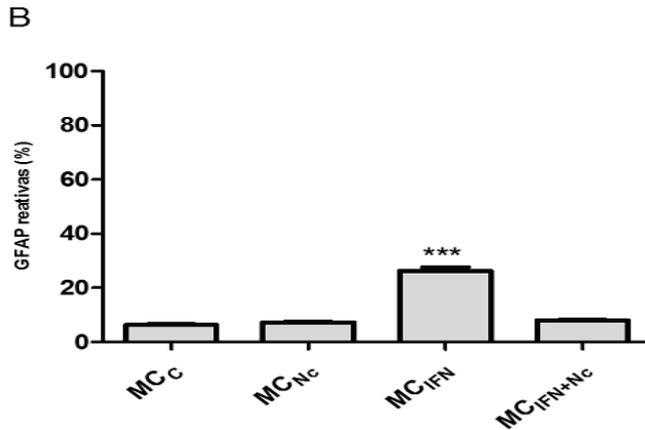


Fonte: Elaboração própria (2016).

Co-cultura de células glias/neurônios cultivadas em MC. **MC_C** (meio condicionado controle de células glias não tratadas e livre de SFB); **MC_{Nc}** (Meio condicionado de células glias infectadas com Nc 1:1). **MC_{IFN}** (meio condicionado de células glias estimuladas com IFN- γ); **MC_{IFN+Nc}** (meio condicionado de células glias estimuladas com IFN- γ e infectadas com *N. caninum*). Fig. A – Coloração com Rosenfeld. Fig. B – Atividade das desidrogenases mitocondriais.

Foram realizados três experimentos independentes e os dados avaliados estatisticamente pelo teste não paramétrico One-Way ANOVA seguido do Teste Kruskal-Wallis e do Pós-Test Dunn's. (*) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo com valor de $P < 0.05$ e (**) com $P < 0,01$.

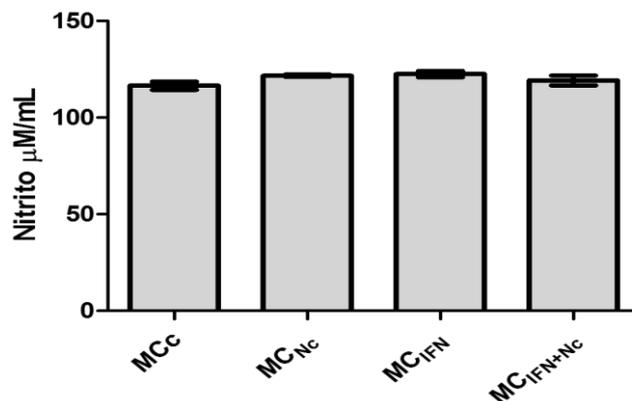
Figura 13 - Efeito da infecção com *N. caninum* sobre a expressão de genes de fatores neurotróficos em culturas de glia avaliados por qRT-PCR



Fonte: Elaboração própria (2016).

Co-cultura de células gliais/neurônios cultivadas em **MC_C** (meio condicionado controle de células gliais não tratadas e livre de SFB); **MC_{Nc}** (Meio condicionado de células gliais infectadas com Nc 1:1). **MC_{IFN}** (meio condicionado de células gliais estimuladas com IFN- γ); **MC_{IFN+Nc}** (meio condicionado de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum* na proporção de 1:1. Fig. A – Imunomarcacão para a proteína GFAP. Fig. B – Número de células GFAP reativas. Foram realizados três experimentos independentes e os dados avaliados estatisticamente pelo teste não paramétrico One-Way ANOVA seguido do Teste Kruskal-Wallis e do Pós-Test Dunn's. (***) $P < 0,001$.

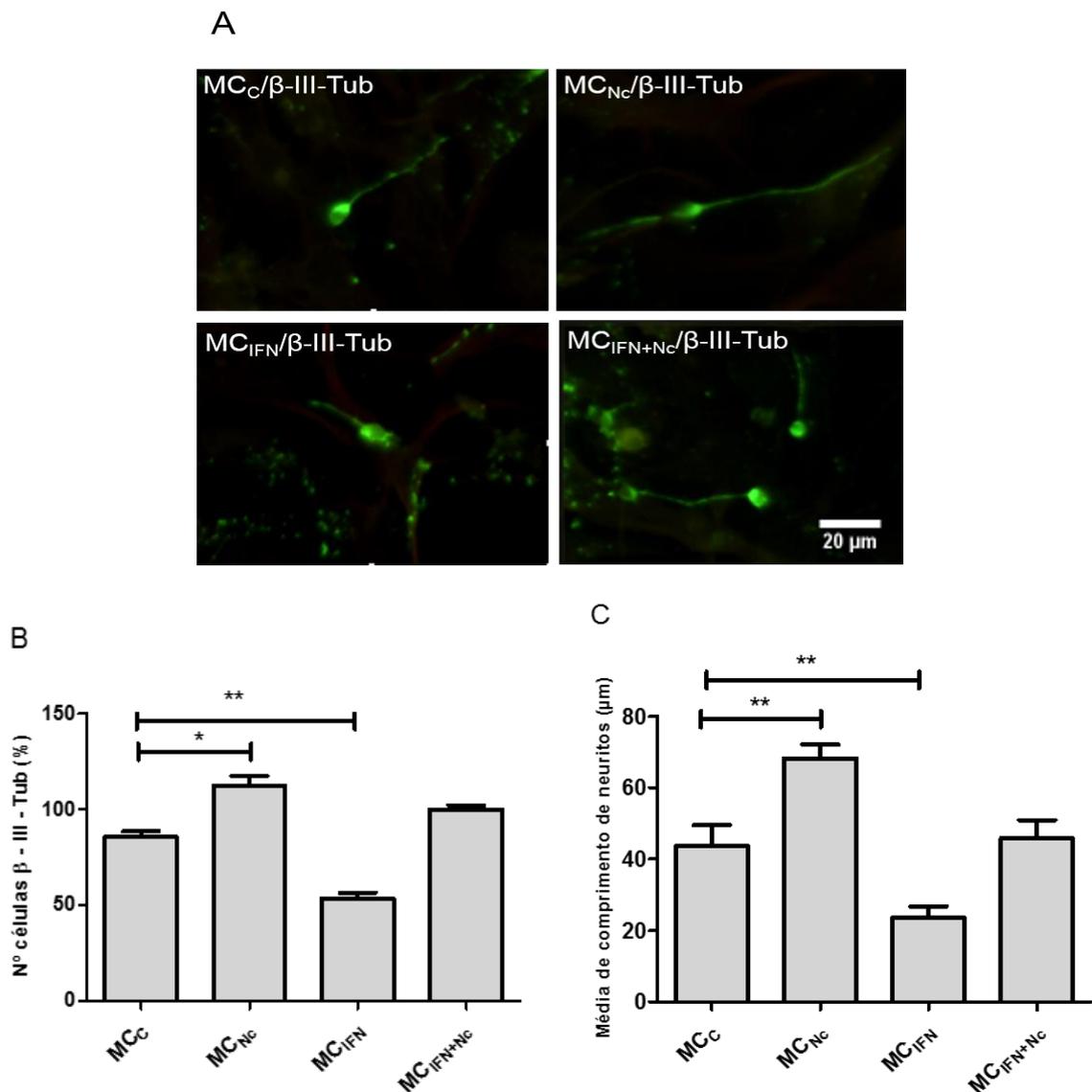
Figura 14 - Efeito do meio condicionado (MC) de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum* sobre a produção de NO avaliado pela dosagem de nitrito em co-culturas neurônios/glia



Fonte: Elaboração própria (2016).

As co-cultura de células gliais/neurônios foram cultivadas em MC de células gliais nas condições: **MC_C** (meio condicionado controle de células gliais não tratadas e livre de SFB); **MC_{Nc}** (Meio condicionado de células gliais infectadas com Nc 1:1). **MC_{IFN}** (meio condicionado de células gliais estimuladas com IFN- γ); **MC_{IFN+Nc}** (meio condicionado de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum*). Foram realizados três experimentos independentes e os dados avaliados estatisticamente pelo teste não paramétrico One-Way ANOVA seguido do Teste Kruskal-Wallis e do Pós-Test Dunn's.

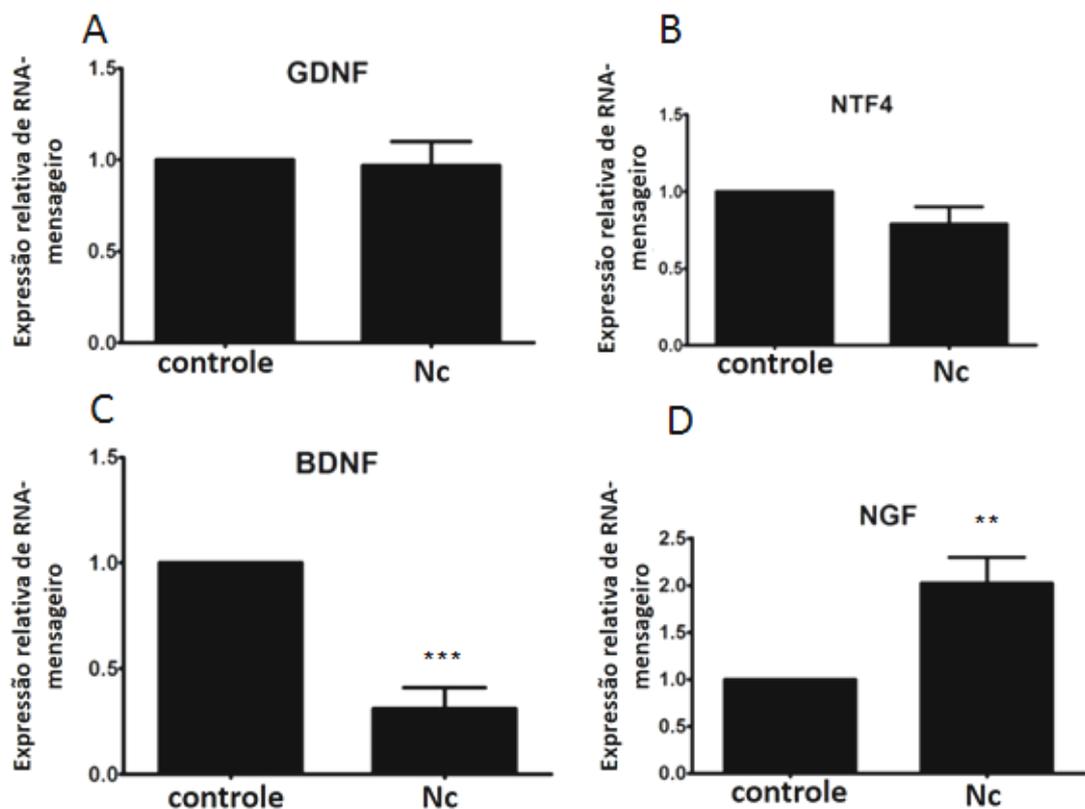
Figura 15 - Efeito do meio condicionado (MC) de *Neospora caninum* por meio da marcação imunocitoquímica para em co-culturas neurônios/glia



Fonte: Elaboração própria (2016).

Co-cultura de células gliais/neurônios cultivadas em **MC_C** (meio condicionado controle de células gliais não tratadas e livre de SFB); **MC_{Nc}** (Meio condicionado de células gliais infectadas com Nc 1:1) **MC_{IFN}** (meio condicionado de células gliais estimuladas com IFN- γ); **MC_{IFN+Nc}** (meio condicionado de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *N. caninum* 1:1). Fig. A – Imunomarcação para a proteína β -III-Tubulina. Fig. B – Número de células β -III-Tub+. Fig. C – Medida de comprimento de neuritos. Foram realizados três experimentos independentes e os dados avaliados estatisticamente pelo teste não paramétrico One-Way ANOVA seguido do Teste Kruskal-Wallis e do Pós-Teste Dunn's. (*) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo com valor de $P < 0.05$. (**) $P < 0,01$.

Figura 16 - Efeito da infecção com *N. caninum* sobre a expressão de genes de fatores neurotróficos em culturas de glia avaliados por qRTP



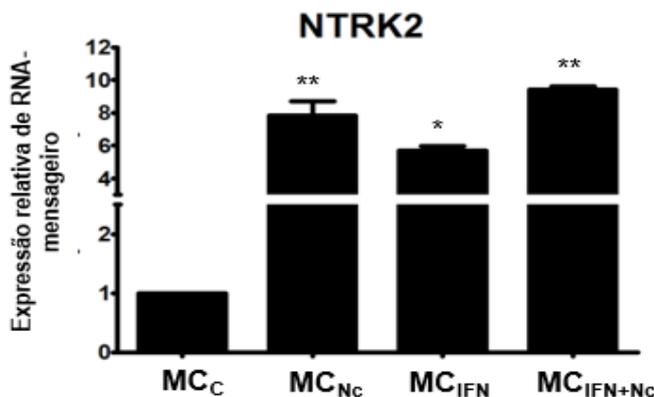
Fonte: Elaboração própria (2016).

As culturas de células gliais foram mantidas em condições (C) controle ou infectadas com *N. caninum* (Nc), na proporção de 1:1. Fig. A – Expressão relativa de

RNA-mensageiro para GDNF. Fig. B – Expressão relativa de RNA-mensageiro para NTF4. Fig. C – Expressão relativa de RNA-mensageiro para BDNF. Fig. D – Expressão relativa de RNA-mensageiro para NGF.

Foram realizados três experimentos independentes e os dados avaliados estatisticamente pelo teste não paramétrico One-Way ANOVA seguido do Teste Kruskal-Wallis e do Pós-Test Dunn's. (**) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo com valor de $P < 0,01$ e (***) $P < 0,001$.

Figura 17 - Efeito do meio condicionado (MC) de células glias estimuladas com IFN- γ infectadas com *N. caninum* e sobre a expressão genica do receptor neurotrófico NTRK2 em co-culturas neurônios/glia.



Fonte: Elaboração própria (2016).

As co-culturas de células glias/neurônios foram cultivadas em MC de células glias nas condições: **MC_C** (meio condicionado controle de células glias não tratadas e livre de SFB); **MC_{IFN}** (meio condicionado de células glias estimuladas com IFN- γ); **MC_{IFN+Nc}** (meio condicionado de células glias estimuladas com IFN- γ e infectadas com *Neospora caninum* na proporção de 1:1). **MC_{Nc}** (Meio condicionado de células glias infectadas com Nc 1:1).

Foram realizados três experimentos independentes e os dados avaliados estatisticamente pelo teste não paramétrico One-Way ANOVA seguido do Teste Kruskal-Wallis e do Pós-Test Dunn's. (**) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo com valor de $P < 0,01$ e (***) $P < 0,001$.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo foi apresentado um modelo de infecção com *Neospora caninum* em células do SNC, visando caracterizar o papel da resposta glial.

Ao avaliar a atividade das desidrogenases mitocondriais em culturas de células gliais sensibilizadas com IFN- γ , por 72 horas, e/ou infectadas com *Nc*, por 48 horas, na proporção 1:1 (parasito/célula), foi observado aumento dessa atividade, quando comparada ao controle. Ao considerar o efeito neurotóxico do IFN- γ , o resultado é contraditório, já que essa citocina é a principal estimuladora da produção de um metabólito tóxico, o óxido nítrico (NO). Porém, Rozenfeld et al. (2003) observaram em culturas de células microgлияis estimuladas com IFN- γ e moduladas com meio condicionado infectado por *T. gondii*, uma proteção celular, devido à modulação do NO na presença do parasito. Por outro lado, Jesus et al. (2013) utilizaram um modelo de estudo de células gliais estimuladas com IFN- γ e infectadas com *N. caninum* na proporção 1:1, por 72 horas, e observaram redução da viabilidade celular, atribuída ao maior tempo da cultura exposta à presença do parasito, causando uma destruição do tapete celular e conseqüente redução dessa viabilidade.

Esta pesquisa mostrou que a resposta astrocitária frente à infecção por *Nc* foi caracterizada por astrogliose, corroborando os achados anteriores. Os astrócitos são ativados em resposta a vários estímulos, a partir de mudanças sutis em seu microambiente, provocadas por dano tecidual. Essa resposta, conhecida por astrogliose – proliferação e hipertrofia, com alargamento do corpo celular e aumento da expressão de GFAP – varia de acordo com o tipo, gravidade, tempo e duração da agressão (BENVENISTE; TANG; LAW, 1995; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Pinheiro et al. (2006, 2010) propuseram um modelo *in vitro* de culturas primárias de células gliais de ratos Wistar infectadas com taquizoitos de *Nc* e identificaram astrogliose. Estudos realizados com culturas organotípicas com cérebro de ratos mostraram que as células predominantemente infectadas por *Nc* foram os astrócitos, que desenvolveram mudanças fenotípicas com morfologia filamentosa e alongada e, quando imunomarcadas para GFAP, apresentaram profunda mudança na distribuição dessa proteína do citoesqueleto (HEMPHILL et al., 2004; VONLAUFEN et al., 2004).

Na presente investigação não foi observado aumento na produção de NO em co-culturas quando expostas ao meio condicionado proveniente de cultura infectadas

com *Nc* (MC_{Nc}), tampouco na presença de estímulo inflamatório com IFN- γ (MC_{IFN+INF}) em relação ao grupo controle. Como descrito por Rozenfeld et al. (2003), o meio condicionado de culturas infectadas por *T. gondii* contém fatores solúveis que podem inibir a formação de NO. Esses autores descreveram uma significativa modulação negativa da produção de NO pela micróglia ativada pelo IFN- γ na presença de meio condicionado de astrócitos infectados pelo *T. gondii*.

Resultados semelhantes foram observados por Jesus et al. (2014), em que co-culturas estimuladas por IFN- γ e infectadas por *Nc* não mostraram aumento na produção de NO. Outros trabalhos apontam que NO não é importante na destruição de *T. gondii* em cultura de astrócitos. Wilson e Hunter (2004) acreditam que astrócitos têm uma forma de destruição desse parasito que não a utilização de NO.

Spohr et al. (2011) demonstraram que meio condicionado de astrócitos tratados com ácido lisofosfatídico induziu diferenciação neuronal, arborização e crescimento de neuritos em progenitores corticais cerebrais. Em acordo com esses achados, o presente estudo demonstrou que co-culturas (neurônios-glia) submetidas ao meio condicionado de culturas de células gliais infectadas por *Nc* (MC_{Nc}) apresentaram aumento da viabilidade celular e de crescimento neurítico, sugerindo que células gliais, quando infectadas com o parasita *Nc*, liberam fatores solúveis que podem estar associados à neuroproteção.

Os resultados da expressão relativa de fatores neurotróficos em culturas de glia infectadas com *Nc* induziram diminuição da expressão de BDNF e aumento da expressão de NGF. Quando co-culturas de glia/neurônios foram expostas ao meio condicionado, dessas culturas gliais, foi observado o crescimento de neuritos e aumento da expressão do receptor NTRK2 (TrkB).

Estudos apontam que os fatores neurotróficos, polipeptídios solúveis agindo por meio de seus receptores específicos promovem sobrevivência, diferenciação, regeneração axonal no sistema nervoso central e periférico. (HALEGOUA; AMSTROUNG; CREMER, 1991; RICHARDSON, 1991; SEBBEN et al., 2011; TERENCEHI, 1999).

O aumento da expressão de NGF e regulação da expressão do receptor NTRK2 poderiam explicar, em parte, no presente estudo, o efeito neuroprotetor após a infecção por *Neospora caninum*.

Estudos da literatura apontam que o *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas, protege fibroblastos cardíacos por ativação do receptor do NGF, TrkA e liberação do fator neurotrófico derivado de parasito (PDNF) em resposta à infecção, permitindo proteção contra o estresse oxidativo, um dos principais desencadeadores da cardiomiopatia chagásica. Assim, pode ser um mecanismo orquestrado por *T. cruzi* para proteger seu *habitat*, o coração (ARIDGIDES; SALVADOR; PEREIRAPERRIN, 2013).

Em estudos realizados por Yuzugullu et al. (2016), a NTRK2 regula a perda de PTEN, regulador negativo da via de sinalização PI3K, que é um acontecimento frequente da leucemia aguda linfoblástica de células T e, de acordo com esses autores, NTRK2 pode ser considerada uma molécula que inibe a apoptose e promove sobrevivência e diferenciação celular.

Estudos da literatura apontam ainda que a sinalização de NTRK2, após ligação de uma neurotrofina, conduz à diferenciação celular, efeito associado ao aumento no número de neurônios. (AMATU; SARTORE-BIANCHI; SIENA, 2016). Diante desse cenário, sugere-se que a presença do parasito *Neospora caninum* modula a resposta imune glial, por meio de fatores neurotróficos capazes de estimular a diferenciação neuronal, em prol da integridade tecidual do SNC.

9 CONCLUSÃO

CULTURA DE CÉLULAS GLIAIS

As células gliais estimuladas com IFN- γ induzem astrogliose, enquanto que as células infectadas com *Neospora caninum* aumentam a expressão do fator de crescimento derivado do nervo (NGF), reduzem a expressão de BDNF, além de que não resultam em alterações na expressão dos fatores neurotróficos GDNF e NTF4.

CO-CULTURA

O MC de células gliais infectadas com *Neospora caninum* e estimuladas com IFN- γ não induziu produção de NO em co-culturas, e o MC_{Nc} induziu viabilidade celular e diferenciação neuronal com aumento no número de neurônios com prolongamentos neuríticos e aumento no receptor neurotrófico para BDNF, NTRK2.

O conjunto desses achados levou à confirmação da hipótese – que a infecção com *Neospora caninum* em cultura de células gliais induz uma resposta glial neuroprotetora por meio da expressão de fatores de crescimento, uma vez que, ao se encistar no tecido cerebral de seus hospedeiros, esse parasito parece estabelecer interações em prol de sua defesa as quais facultam a cronicidade da infecção.

Conclui-se que, na relação parasito/hospedeiro, ao mesmo tempo em que um patógeno agride uma célula, na tentativa de sobrevivência, são deflagrados mecanismos de proteção que resultam em benefícios mútuos. Esses achados apontam para um papel relevante do parasito durante o processo de neuromodulação da resposta imune, com especial atenção para o papel neuroprotetor desencadeado pelas neutrofinas.

REFERÊNCIAS

ALOE, L. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. **Trends cell. biol.**, Cambridge, v. 14, n. 7, p. 395-399, 2004.

AMATU, A.; SARTORE-BIANCHI, A.; SIENA, S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. **ESMO Open**, Austria, v. 1:e000023, 2016.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Anim. reprod. sci.**, Amsterdam, v. 60-61, n. 1, p. 417-431, 2000.

ANDRIANARIVO, A. G. et al. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitol. res.**, Berlin, v. 96, n. 1, p. 24-33, 2005.

ARIDGIDES, D; SALVADOR, R; PEREIRAPERRIN, M. *Trypanosoma cruzi* coaxes cardiac fibroblasts into preventing cardiomyocyte death by activating nerve growth factor receptor TrkA. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 2, e57450, 2013.

BANATI, R. B. et al. Cytotoxicity of micrógliia. **Glia**. v. 7, n. 1, p.111–118, 1993.

BENVENISTE, E. N.; TANG, L. P.; LAW, R. M. Differential regulation of astrocyte TNF- α expression by the cytokines TGF- β , IL-6 and IL-10. **Int. j. dev. neurosci.**, Oxford, v. 13, n. 3-4, p. 341-349, 1995.

BOTHWELL, M. Evolution of the neurotrophin signaling system in invertebrates. **Brain behav. evol.**, Basel, v. 68, n. 3, p. 124-132, 2006.

BOTHWELL, M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. **F1000 res.**, London, v. 5, n. 1885, p. 1885, 2016.

BOULLE, F. et al. TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders. **Prog. neurobiol.**, Oxford, v. 98, n. 2, p. 197-206. 2012.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nat. rev. neurosc.**, London, v. 4, n. 4, p. 299-309, 2003.

CHUENKOVA, M. V.; PEREIRAPERRIN, M. A. PDNF, a human parasite-derived mimic of neurotrophic factors, prevents caspase activation, free radical formation, and death of dopaminergic cells exposed to the Parkinsonism-inducing neurotoxin MPP+. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 50-61, 2003.

CHUENKOVA, M. V.; PEREIRAPERRIN, M. *Trypanosoma cruzi*-derived neurotrophic factor: role in neural repair and neuroprotection. **J. neuromicrobiol.**, New York, v. 1, n. 1, p. 55-66, 2010.

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

- DUBEY, J. P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Chicago, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.
- DUBEY, J. P. et al. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **Int. j. parasitol.**, New York, v. 28, n. 8, p. 1293-1304, 1998.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals: the last five years. **Vet. parasitol.**, Amsterdam, v. 180, n. 1, p. 90-108, 2011.
- ESCARTIN, C.; BONVENTO, G. Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. **Mol. Neurobiol.**, New York, v. 38, n. 3, p. 231-241, 2008.
- FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends immunol.**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 138-145, 2007.
- FISCHER, H. G.; REICHMANN, G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. **J. immunol.**, Baltimore, v. 166, n. 4, p. 2717-2726, 2001.
- GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estud. av.** [online], São Paulo, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.
- 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. **Vet. parasitol.**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2001.
- HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. immunol. methods**, Amsterdam, v. 119, n. 2, p. 203-210, 1989.
- HALEGOUA, S.; AMSTROUNG, R. C.; CREMER, N. E. Dissecting the mode of action of neuronal growth factor. **Microbiol. immunol.**, Tokyo, v. 165, p. 119-170, 1991.
- HEMPHILL, A. et al. Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. **Microsc. microanal.**, New York, v. 10, n. 5, p. 602-620, 2004.
- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Ann. rev. neurosci.**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 677-736, 2001.
- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Ann. rev. biochem.**, Palo Alto, v. 72, n. 2, p. 609-642, 2003.
- INNES, E. A. et al. Neosporosis: aspects of epidemiology and host immune response. **Ann. N. Y. Acad. sci.**, New York, v. 916, TOC, p. 93-101, 2000.

ITO, K.; ENOMOTO, H. Retrograde transport of neurotrophic factor signaling: implications in neuronal development and pathogenesis. **J. Biochem.**, London, v. 160, n. 2, p. 77-85, 2016.

JESUS, E. E. V. et al. Effects of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. **Exp. parasitol.**, New York, v. 133, n. 3, p. 269-274, 2013.

JESUS, E. E. V. et al. Role of IFN- γ and LPS on neuron/glial co-cultures infected by *Neospora caninum*. **Front. cell. neurosc.**, Lausanne, v. 8, n. 340, p. 1-9, 2014.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr. opin. neurobiol.**, London, v. 10, n. 3, p. 381-391. 2000.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011.

KURUVILLA, R. et al. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. **Cell.**, Cambridge, v. 118, n. 2, p. 243-255, 2004.

LIU, W.; TANG, Y.; FENG, J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. **Life sci.**, Oxford, v. 89, n. 5-6, p.141-146, 2011.

LIU, Y. et al. The effects of different phenotype astrocytes on neural stem cells differentiation in co-culture. **Neurosci. lett.**, Amsterdam, v. 508, n. 2, p. 61-66, 2012.

McALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. j. parasitol.**, New York, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MOWLA, S. J. et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. **J. biol. chem.**, Baltimore, v. 276, n. 16, p. 12660-12666, 2001.

NAKAGAWARA, A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. **Cancer lett.**, Virginia, v. 169, n. 2, p. 107-114, 2001.

OHSAWA, K. et al. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 88, n. 4, p. 844-856, 2004.

PINEAU, I.; LACROIX, S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. **J. comp. neurol.**, New York, v. 500, n. 2, p. 267-285, 2007.

PINHEIRO, A. M. et al. Astroglial cells in primary culture: a valid model to study *Neospora caninum* infection in the CNS. **Vet. immunol. immunopathol.**, Amsterdam, v. 113, n. 1-2, p. 243-247, 2006.

- PINHEIRO, A. M. et al. *Neospora caninum*: early immune response of rat mixed glial cultures after tachyzoites infection. **Exp. parasitol.**, New York, v. 124, n. 4, p. 442-447, 2010.
- REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos. trans. royal soc. Lon., Ser. B; Biol. sci.**, Londres, v. 361, n. 1473, p. 1545-1564, 2006.
- REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T.; DUBEY, J. P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **J. small anim. pract.**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 308-312, 2007.
- REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **Int. j. parasitol.**, New York, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.
- RICHARDSON, P. M. Neurotrophic factors in regeneration. **Curr. opin. neurobiol.**, London, v. 1, n. 3, p. 401-406, 1991.
- ROCK, R. B. et al. Role of micrógliia in central nervous system infections. **Clin. microbiol. rev.**, Washington, v. 17, n. 4, p. 942-964, 2004.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 329-334, 1947.
- ROSTWOROWSKI, M. et al. Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. **J. neurosci.**, Washington, v. 17, n. 10, p. 3664-3674, 1997.
- ROZENFELD, C. et al. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated micrógliia and prevent neuronal degeneration. **Infect. immun.**, Washington, v. 71, n. 4, p. 2047-2057, 2003.
- SAWADA, H.; SHIMOHAMA, S. MPP(+) and glutamate in the degeneration of nigral dopaminergic neurons. **Parkinsonism relat. disord.**, Kidlington, v. 5, n. 4, p. 209-215, 1999.
- SCOTT, F. Gilbert. **Developmental Biology**. 9. ed. USA: Sinauer, 2010. - ISBN-13: 978-0878935581. 711 p.
- SEBBEN, A. D. et al. Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair. **Sci. med.**, Porto Alegre, v. 21, n. 2, p. 81-89, 2011.
- SHEMER, A. et al. Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective. **Trends Immunol.**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 614-624, 2015.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta neuropatol.**, Berlin, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.

SPOHR, T. C. et al. Astrocytes treated by lysophosphatidic acid induce axonal outgrowth of cortical progenitors through extracellular matrix protein and epidermal growth factor signaling pathway. **J. neurochem.**, Oxford, v. 119, n. 1, p. 113-123, 2011.

SPOHR, T. C. et al. LPA-primed astrocytes induce axonal outgrowth of cortical progenitors by activating PKA signaling pathways and modulating extracellular matrix proteins. **Front. cell. neurosc.**, Lausanne, v. 8, n. 1, p. 296, 2014.

STRACK, A. et al. Chemokines are differentially expressed by astrocytes, microglia and inflammatory leukocytes in *Toxoplasma* encephalitis and critically regulated by interferon-gamma. **Acta neuropatol.**, Berlin, v. 103, n. 5, p. 458-468, 2002.

TERENGI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J. anat.**, London, v. 194(Pt 1), p. 1-14, 1999.

VONLAUFEN, N. et al. In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vivo cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. **Infect. Immun.**, Washington, v. 72, n. 1, p. 576-583, 2004.

WEBER, F. H. et al. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of *Neospora*-associated fetal loss in cattle. **Clin. vaccine immunol.**, Washington, v. 20, n. 1, p. 99-105, 2013.

WILLIAMS, D. J. L. et al. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. **Infect. immun.**, Washington, v. 75, n. 3, p. 1343-1348, 2006.

WILSON, K. H. S. The genome sequence of the protostome *Daphnia pulex* encodes respective orthologues of a neurotrophin, a Trk and a p75NTR: evolution of neurotrophin signaling components and related proteins in the bilateria. **BMC evol. biol.**, London, v. 9 (2009), p. 243, 2009.

WILSON, E. H.; HUNTER, C. A. The role of astrocytes in the immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. **Int. j. parasitol.**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 543-548, 2004.

YAMANE, I. et al. In vitro isolation and characterisation of a bovine *Neospora* species in Japan. **Res. vet. sci.**, London, v. 63, n. 1, p. 77-80, 1997.

YUZUGULLU, H. et al. NTRK2 activation cooperates with PTEN deficiency in T-ALL through activation of both the PI3K-AKT and JAK-STAT3 pathways. **Cell. Discovery**, London, v. 2, p. 16030, 2016.

ZAGAAR, M. et al. Regular treadmill exercise prevents sleep deprivation-induced disruption of synaptic plasticity and associated signaling cascade in the dentate gyrus. **Mol. cell. neurosci.**, San Diego, v. 56, p.375-383, Sept. 2013.

ZHANG, D. et al. Astroglisis in CNS pathologies: is there a role for micróglia?
Mol. neurobiol., New York, v. 41, n. 2-3, p. 232-241, 2010.

ANEXO

ANEXO - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal da Bahia
 Instituto de Ciências da Saúde
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa do protocolo número **0412013**, intitulado "**Atividade dos sistemas enzimáticos na modulação da resposta imune glial ao Neospora caninum**", sob a responsabilidade da Professora Doutora Maria de Fátima Dias Costa, lotada no Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **10 de maio de 2013**.

CERTIFICATE

We certify that the research project with protocol number **041/2013** entitled "**Assessment of Enzyme systems in modulating the immune response to glial Neospora caninum**", under the responsibility of Professor Maria de Fatima Dias Costa, from the Biofunção Department of the Institute of Health Sciences (ICS), Federal University of Bahia (UFBA). The presented project is in agreement to the Brazilian Law on Animal Experimentation and with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian Society of Animal Science Laboratory (SBCAL) and was **approved** by this Ethics Committee on Animal Use of the Institute of Health Sciences (CEUA-ICS) on **May 10, 2013**.

Salvador, 10 de maio de 2013.


 Prof. Dra. Songeli Menezes Freire
 Coordenadora da CEUA-ICS