



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



GREGORY ALVES FERRAZ

**EFEITO *in vitro* DA INFECÇÃO POR TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum*
SOBRE MICROGLIA DE CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS
NEONATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SALVADOR - BAHIA
2013

GREGORY ALVES FERRAZ

**EFEITO *in vitro* DA INFECÇÃO POR TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum*
SOBRE MICROGLIA DE CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS
NEONATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Imunologia - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Dias Costa
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

SALVADOR - BAHIA
2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

F381e Ferraz, Gregory Alves
Efeito *in vitro* da infecção por taquizoítos de *N. caninum* sobre microglia de córtex cerebral de ratos neonatos. / Gregory Alves Ferraz. – Salvador, 2013.

49f. il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Parasitologia. 2. Imunologia. 3. *Neospora caninum*. I. Costa, Maria de Fatima Dias. II. Pinheiro, Alexandre Moraes. III. Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde. Bahia. IV. Título.

CDU 615.37:576.89



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



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO **Gregory
Alves Ferraz**.

Aos vinte e seis dias do mês de abril do ano de dois mil e treze às dez horas no Auditório Ophélia Gaudenzi, no 3º andar no Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Maria de Fátima Dias Costa, Orientadora, Dra. Maria Ângela Ornelas de Almeida e Dr. Aristeu Vieira da Silva se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "Avaliação da resposta imunomodulatória de células da microglia durante a infecção por *Neospora caninum*" do Mestrando Gregory Alves Ferraz. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando teve a sua defesa de Dissertação APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pelo Mestrando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Salvador, 26 de abril de 2013.

Dra. Maria de Fátima Dias Costa
Orientadora

Dr. Aristeu Vieira da Silva
Banca Examinadora

Dra. Maria Ângela Ornelas de Almeida
Banca Examinadora

Gregory Alves Ferraz
Mestrando

Profa. Dra. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
ICS-UFBA

Dedico minhas linhas a todos que fizeram esse momento possível em maior e menor escala. A vocês escrevo nas estrelinhas. Entre-tortas. Entre-minhas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha mãe e ao meu pai pelo constante apoio em todas as decisões tomadas em minha vida. A minha outra mãe (Vovó Maria), pelo exemplo de vida a seguir e pelo grande alicerce que representa em mim. Ao meu irmão pelas palavras de carinho e força que mesmo distantes se fazem tão presentes. E a minha eterna companheira e irmã, cujo amor ainda não encontrei igual, meu eterno agradecimento por ser o ombro onde minha cabeça recosta. A vocês o tudo, o nada e o entre.

A uma pessoa muito especial na minha vida, cujos momentos compartilhados de felicidade, companheirismo e compreensão fizeram dessa minha tarefa um momento tão mais agradável. A você Marise meu singelo obrigado e um eterno lugar do lado esquerdo.

A minha segunda família que chamo de amigos. Em especial ao meu grande amigo Bona que tenho tanto carinho e toda sua família, que sempre me fez sentir acolhido. Outro especial a uma irmã que a vida me deu, Susi, você não sabe o quanto aprecio sua presença em minha vida. Aos pivetes: Felipe C, Anderson, Neilton, Elkiaer e Gerson. As demoninhas: Vanessa, Rebeca, Isana e Hemilly. E claro, a todos outros que são eternamente lembrados pelos bons momentos e sorrisos compartilhados. As luluzinhas: Evelin, Teka, Renata, Mona, Ravena, Priscila, Lorena, Thais e Tassianne E os bolinhas: Marcel, Lucas, Chico, Luã, João, Luã, Márcio, Eric, Felipe G, Felipe B., Felipe M, Stéfane e Thomaz.

A todos do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, que fizeram trabalho tornar-se prazer, em especial ao grupo Neuro In.

Aos funcionários do ICS, dentre eles os professores por minha formação, aos funcionários do PPGIm, especialmente a Dilcéia, por ter me guiado quando pensava ser o mestrado apenas um sonho. E a todos outros que cuidam com tanto zelo do instituto.

Por fim, a minha orientadora Prof^a Maria de Fátima Dias Costa. Por ter feito tudo isso possível a mim, com certeza, foi um período de crescimento pessoal, profissional e intelectual. E a ela dedico grande parte desses ganhos, por ser uma pessoa que acreditou e me incentivou por diversas vezes. Se dizem que a única atitude intelectual digna de uma criatura superior é a de uma calma e fria compaixão por tudo quanto não é ele próprio. Então essa é você, obrigado por tudo.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin (1889 – 1977).

Efeito *in vitro* da infecção por taquizoítos de *N. caninum* sobre microglia de córtex cerebral de ratos neonatos

RESUMO

A neosporose acomete muitas espécies animais, causando-lhes manifestações clínicas de natureza neuro muscular e tem sido apontada como um dos fatores que acarreta prejuízos econômicos na pecuária mundial. Seu agente etiológico, o *N. caninum*, é controlado por mecanismos de imunidade mediada por células, com destaque de papel protetor para os linfócitos T, que tem variação na sua resposta a depender do tecido parasitado. No sistema nervoso central ocorre um balanço imunológico muito preciso onde a forma infectante do parasito - os taquizoítos - estimula a produção de citocinas do tipo T_H1, que acarretariam no controle da sua proliferação. Neste tecido, as células neurogliais parecem responder com a produção de citocinas T_H2, com intuito de evitar ou controlar lesões causadas pela resposta pró-inflamatória. O presente estudo investigou o papel imunomodulatório das culturas primárias de microglia durante infecção com taquizoítos de *N. caninum*. As células, obtidas de cérebro de ratos neonatos, foram infectadas por 72h com o parasito e, para obtenção de controle positivo, foram tratadas com LPS pelo mesmo período. Ensaios de Azul de Trypan e MTT foram realizados para testar a viabilidade celular. Foi observado que as células infectadas e aquelas tratadas com LPS apresentaram significativa perda de viabilidade, cuja causa pode ter sido o aumento significativo dos níveis de nitrito, contudo este evento não contribuiu para o controle da proliferação parasitária. A resposta dessas células ao estímulo parasitário não acarretou tampouco liberação de citocinas inflamatórias (TNF e IFN- γ) e somente quando pré-tratadas com LPS, tiveram níveis de TNF aumentados. Esses dados são compatíveis com a possível modulação negativa da citocina IL-10, que foi encontrada aumentada em ambos tratamentos. Os resultados apontam para a incapacidade das células microgliais isoladas em controlar a proliferação de taquizoítos, ainda que estas, em interação com demais tipos celulares no contexto do tecido cerebral, tenham papel destacado na modulação da resposta ao *N. caninum*.

Palavras-chaves: *Neospora caninum*, microglia, resposta imune.

Effect of *in vitro* infection with *N. caninum* tachyzoites in microglia from neonatal rat cerebral cortex

ABSTRACT

Neosporosis affects many animal species, causing clinical manifestation of neuro muscular origins. And has been identified as one of the factors that cause economic losses in livestock worldwide. Its etiological agent, *N. caninum*, initially, is controlled by mechanisms of cell-mediated immunity, highlighting the protective role of T lymphocytes, which ranges in its response depending on the tissue parasitized. In the central nervous system occurs a very precise immune balance where the infective form of the parasite - the tachyzoites - stimulates the production of TH1-type cytokines, which would lead to control their proliferation and the glial cells seem to respond with the production of TH2-type cytokines, in order to prevent tissue damage caused by pro-inflammatory response. The present study investigated the immunomodulatory role of primary cultures of microglia during infection with tachyzoites of *N. caninum*. The cells, obtained from neonatal rat brain, were infected for 72h with parasite and a positive control was obtained by the treatment with LPS for the same period. Trypan Blue and MTT assays were performed to test the cell viability. It was observed that the infected cells and those treated with LPS showed significant loss of viability, which may have been caused by the significant increase in nitrite levels, however, this event did not contributed to the control of parasite proliferation. The response of these cells to parasite stimulation did not cause release of inflammatory cytokines (TNF and IFN- γ) and only when pre-treated with LPS they showed increased levels of TNF. These data are consistent with the possible down modulation of the cytokine IL-10 that were found increased in both treatments. These results point to the inability of isolated microglial cells in controlling the proliferation of tachyzoites, although its interaction with other cell types within the brain tissue has a prominent role in modulating the response to *N. caninum*.

Keywords: *Neospora caninum*, microglia, immune response.

LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E GRÁFICOS

DA INTRODUÇÃO

Figura 1 – Ciclo de vida do *Neospora caninum*.

Figura 2 – Células do SNC: microglia, astrócito, oligodendrócito, neurônio e células ependimárias.

Figura 3 – Principais rotas de estimulação que causam microgliose.

Esquema 1 – Principais rotas de comunicação via citocinas e quimiocinas entre microglia e células residentes e invasoras.

Esquema 2 – Mecanismo de resposta imune que atuam contra taquizoítos de *Neospora caninum*.

Esquema 3 – Mecanismo de resposta imune adquirida (humoral) que atuam contra taquizoítos de *Neospora caninum*.

DOS RESULTADOS

Figura 1 – Imunodeteção de GFAP e OX-42 em cultura de microglia, através de microscopia de fluorescência.

Figura 2 – Microscopia de fluorescência e de contraste de fase das culturas de microglia controle, infectada com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratada com LPS (10µg/mL), avaliadas 72h após infecção.

Esquema 1 – Resultados obtidos. Gráfico 1 – Quantidade de taquizoítos após 72 horas de infecção.

Gráfico 2 – Viabilidade celular avaliada pelo teste de Azul de Trypan em células da microglia infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratadas com LPS (10µg/mL), avaliadas 72 horas pós-infecção.

Gráfico 3 – Viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT em células da microglia infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratadas com LPS (10µg/mL), avaliadas 72 horas pós-infecção.

Gráfico 4 – Níveis de nitrito no sobrenadante de células da microglia infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratadas com LPS (10µg/mL), avaliadas 72 horas pós-infecção.

Gráfico 5 – Níveis de IL-10, TNF e IFN-γ no sobrenadante de células da microglia infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratadas com LPS (10µg/mL), avaliadas 72 horas pós-infecção.

LISTA DE SIGLAS

APC – Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês *Antigen-presenting cell*)

BHE – Barreira Hemato Encefálica

DMEM-F12 – Meio nutriente modificado (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium- Nutrient Mixture F-12 Ham*)

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial (do inglês *Glial fibrillary acidic protein*)

IFN- γ – Interferon Gama

IL – Interleucina

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível (E.C. 1.4.13.39)

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês *Major histocompatibility complex*)

MTT – [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo Difeniltetrazol]

NGMA – NG-metil-L-arginina (do inglês *NG-methyl-L-arginine*)

L-NIL – L-N6-(1-iminoetilo)-lisina, hidrocloreto (do inglês L-N6-(1-iminoethyl)-lysine, hydrochloride)

NK – *Natural Killers*

NO – Óxido Nítrico (do inglês *Nitric oxide*)

PAMP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*)

PBS – Solução de Tampão Fosfato (do inglês *Phosphate buffered saline*)

PGE₂ – Prostaglandina E2

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium dodecyl sulfate*)

SNC – Sistema Nervoso Central

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento Beta (do inglês *Transforming growth factor beta*)

T_H – T *helper*

TNF – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor necrosis factors*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Neospora caninum</i> e neosporose.....	1
1.2 O sistema nervoso central – características e papéis funcionais das células gliais.....	4
1.3 Resposta imune no sistema nervoso central.....	7
1.4 Resposta imune na infecção por <i>Neospora caninum</i>	10
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. RESULTADOS.....	18
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
6. REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Neospora caninum* e neosporose

Há quase três décadas, foi descrito na Noruega, a existência de um protozoário formador de cistos no sistema nervoso central (SNC) e no tecido muscular de filhotes de cães (BJERKAS *et al.*, 1984). Parish *et al.*, (1987) descreveram encefalomielite associada à presença de cistos desse protozoário em tecido cerebral de bezerros que não apresentavam anticorpos contra *Toxoplasma gondii*. Em 1988, Dubey *et al.*, depois de observações sucessivas isolaram e caracterizaram um novo parasito, o *Neospora caninum*, que é o agente etiológico da neosporose e apresenta semelhanças morfológicas com o *T. gondii*. Em 2002, Dubey *et al.*, redescreveram o parasito, esclarecendo de forma mais precisa a exata relação filogenética do *N. caninum* com outros membros do filo Apicomplexa.

O *N. caninum* é um protozoário que está associado com o aborto bovino tendo, portanto, impacto econômico significativo para a pecuária mundial (DUBEY *et al.*, 2002).

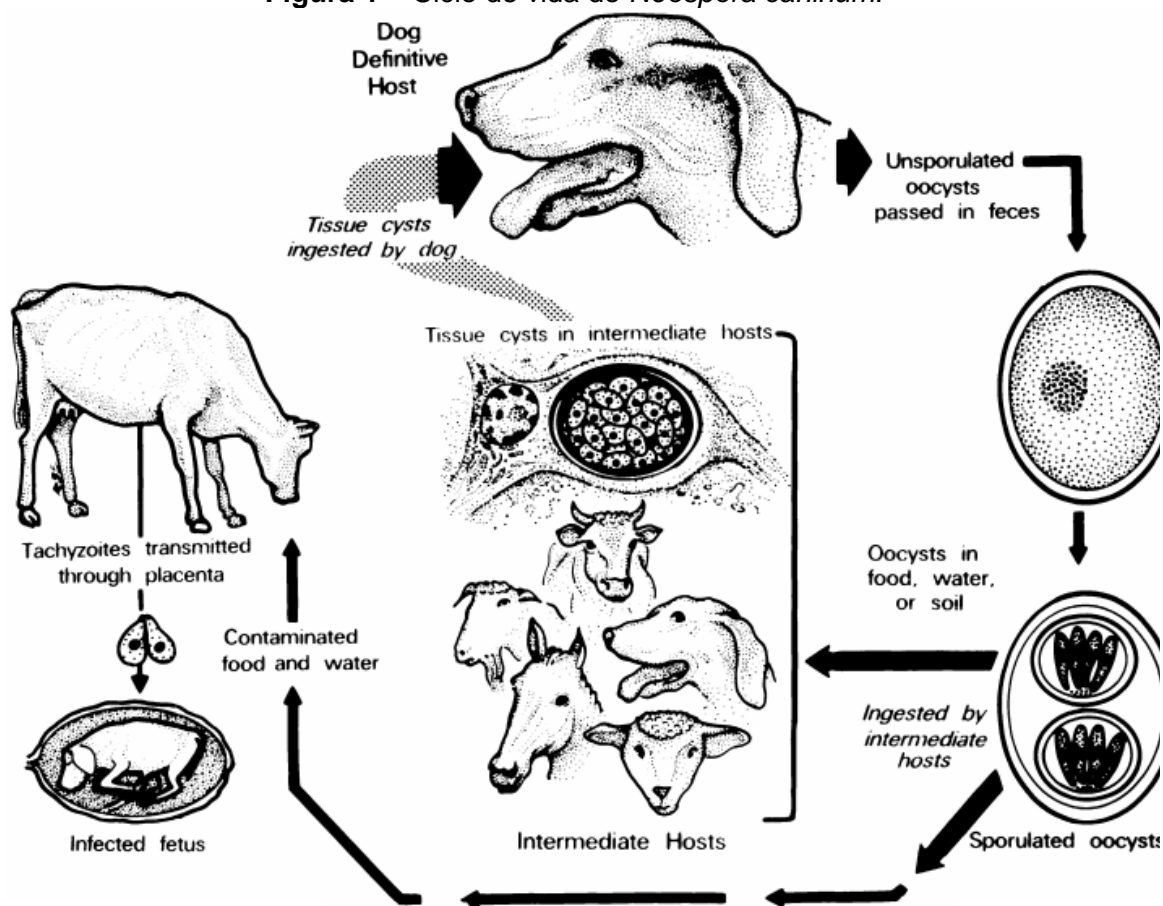
McAllister *et al.* (1998) foram os primeiros a mostrar que o cão é o hospedeiro definitivo de *N. caninum*. Em 2004, Gondim *et al.* apontaram coiotes como sendo também hospedeiros definitivos desse parasito e que outros hospedeiros definitivos não podem ser descartados. A presença desse protozoário foi também relatada em várias outras espécies animais, incluindo bovinos, ovinos, caprinos, equinos e cervos (DUBEY e SCHARES, 2011).

O ciclo de vida do parasito é constituído pelos estágios de oocistos, taquizoítos e bradizoítos. Os oocistos compreendem a forma eliminada pelo hospedeiro definitivo, enquanto os taquizoítos são caracterizados pela rápida multiplicação na célula hospedeira, promovendo lesões teciduais (MCALLISTER *et al.*, 1998). Os bradizoítos correspondem à forma evolutiva encontrada durante a fase latente da infecção, em que o parasito se multiplica lentamente devido ao desencadeamento da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (HEMPHILL *et al.*, 2006).

A compreensão atual acerca de seu ciclo de vida aponta que uma possível

rota de transmissão em bovinos dá-se através da ingestão oral de oocistos contendo esporozoítos (Figura 1). Os esporozoítos representam um estágio infectante e resulta da replicação assexuada (e proliferação) do agente no meio ambiente (DUBEY *et al.*, 2002). Quando são liberados dos oocistos, eles infectam o tecido intestinal, atravessam o epitélio, atingem vasos sanguíneos e linfáticos, além de parasitarem outras células, incluindo macrófagos e linfócitos. Na fase inicial (fase aguda) da infecção eles se disseminam por todo o corpo e, em analogia ao *T. gondii*, transformam-se para a fase de rápida proliferação intracelular – de taquizoítos, o que causa lesão tecidual através de sucessivas multiplicações e lise das células hospedeiras, levando a eventos imunopatológicos (DUBEY *et al.*, 2006). O sistema imunológico do hospedeiro irá reagir ao parasito e este é um dos fatores que desencadeiam a fase de conversão de taquizoítos para bradizoítos, de proliferação lenta (fase crônica), favorecendo à sua permanência no tecido (BUXTON *et al.*, 2002). Bradizoítos representam pois, uma fase quiescente do parasito, que forma cistos teciduais intracelulares cercados por uma parede que apresenta positividade ao ácido periódico (reativo de Schiff). Esta parede do cisto protege o parasito contra reações imunológicas e fisiológicas por parte do hospedeiro, permitindo sua sobrevivência de forma latente, em animais imunocompetentes infectados, sem causar sintomas.

Figura 1 – Ciclo de vida do *Neospora caninum*.



Fonte: Dubey, 1999, p. 350.

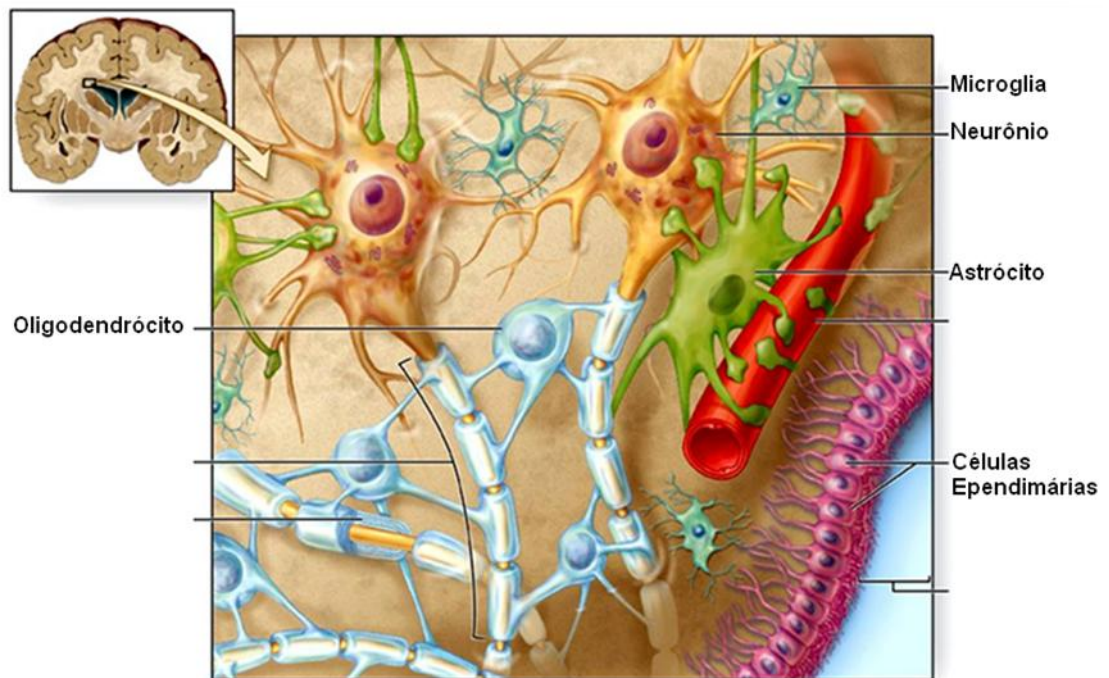
Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório e o estágio de taquizoíto, é capaz de invadir uma variedade de tipos de células e tecidos *in vivo* e *in vitro*. No entanto, o cérebro é um órgão cuja frequência de parasitemia é relatada com bastante frequência (DUBEY e LINDSAY, 1996). Cistos contendo bradizoítos de *N. caninum* foram detectados, com poucas exceções, no SNC (DUBEY e LINDSAY, 1996). Assim, esse tecido representa um local de predileção desse parasito, em infecções natural ou experimental.

Os sinais clínicos apresentados por cães acometidos pela neosporose são geralmente de natureza neuromuscular, a exemplo da hiperextensão rígida, da paralisia progressiva dos membros posteriores, da mandíbula (dificuldade de deglutição), flacidez e atrofia muscular (DUBEY e LINDSAY, 1996). A doença pode ser fatal, principalmente em animais diagnosticados e tratados de forma tardia, (GIRALDI *et al.*, 2001).

1.2 O sistema nervoso central – características e papéis funcionais das células gliais

O tecido nervoso é caracterizado por sua estrutura complexa e heterogeneidade de tipos celulares (Figura 2). A população celular do SNC pode ser dividida em neurônios e células gliais. As primeiras são células especializadas na condução de um potencial de ação ao longo de sua membrana plasmática e na passagem dessa sinalização a outras células semelhantes (NDUBAKU e BELLAR, 2008).

Figura 2 – Células do SNC: microglia, astrócito, oligodendrócito, neurônio e células ependimárias.



Fonte: Página da internet¹

Disponível em: http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/Nervous%20System.htm
> Acesso em jan. 2013.

A ‘família glial’ só foi descoberta no século XIX, pelo patologista alemão Rudolf Virchow, que foi o primeiro a descrever novos fenótipos celulares, além dos neurônios, presentes em todo o sistema nervoso. Tais células, foram chamadas de *nevenkitt* (neuroglia), que significa “cola neural”, termo cunhado no seu livro “Patologia Celular” em 1856.

Desde a descrição de Virchow e os cerca de 100 anos que se seguiram, as

células gliais foram consideradas como elementos passivos, com função de exercer apenas a sustentação dos neurônios. No entanto, nas últimas décadas, diversos trabalhos têm comprovado que as mesmas são responsáveis por muito mais ações neste sistema.

O surgimento das células gliais ocorre por meio de um processo denominado de gliogênese, o qual é controlado pelo balanço entre a ativação de alguns genes e a modulação dos mesmos por fatores epigenéticos (LEE *et al.*, 2000).

As células gliais compõem a neuroglia e são morfológica e funcionalmente bastante diversificadas, sendo classicamente divididas em dois grupos. O primeiro compreende as células denominadas de microgliais, derivadas do mesoderma e o segundo, é composto por células macrogliais, representados por oligodendrócitos, células de Schwann, ependimócitos e astrócitos, que são tipos celulares derivados do neuroectoderma embrionário. O último tipo celular, a astroglia, dependendo de seu estágio de desenvolvimento ou de sua localização, se subdivide em células da glia radial, da glia marginal, da glia de Bergmann (localizadas no córtex cerebelar), da glia de Muller (retina), tanicitos (hipotálamo), entre outras. Os astrócitos, apresentam corpo celular irregular no formato de estrela e pés terminais formando amplos processos. Eles interagem bastante com os neurônios e prestam-lhes importante apoio estrutural e metabólico.

Oligodendrócitos, por sua vez, têm relativamente pequena quantidade de citoplasma ao redor do núcleo e têm vários processos que se enrolam ao redor dos axônios para formar bainhas de mielina.

A microglia, de origem hematopoiética, é a menor das células gliais, agem como fagócitos, sendo células imuno-efetoras do SNC (HE e SUN, 2007).

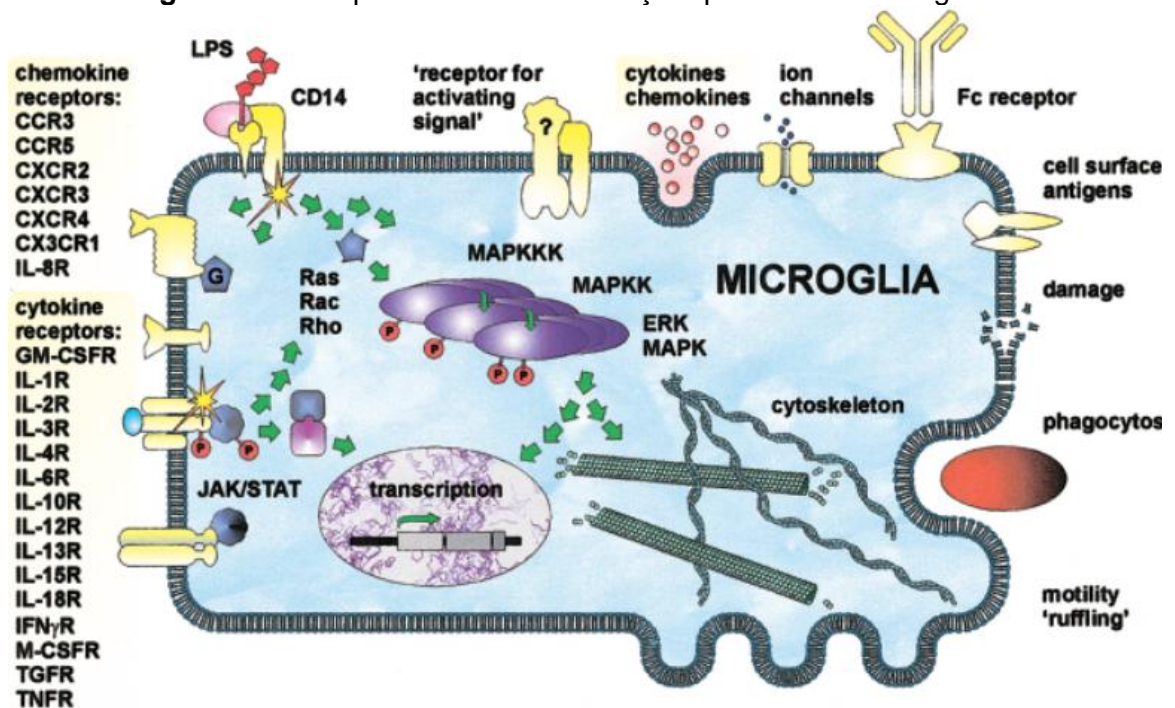
Sabe-se que as células da glia desempenham um papel na homeostasia do tecido, removendo a liberação extra de neurotransmissores pelos neurônios durante a transmissão sináptica e equilibrando a força iônica do meio ambiente neuronal (HE e SUN, 2007). Além disso, podem estar relacionadas com liberação de fatores de crescimento e neuromoduladores, que regulam a sinaptogênese e plasticidade sináptica (HE e SUN, 2007). Essas células também auxiliam na formação da barreira hemato encefálica (BHE), que impede as substâncias tóxicas do sangue, entrarem no cérebro.

As células gliais respondem aos danos no tecido nervoso através de um

conjunto de alterações morfológicas conhecidas como gliose. Essas células podem reagir a sinais originários de neurônios lesionados e a vários outros agentes físicos ou químicos, incluindo agressões causadas por microrganismos.

Estudos recentes têm sugerido, por exemplo, que a microglia atua como células de alerta para os sistemas imune e nervoso. No SNC saudável essas células são quiescentes, porém, em caso de distúrbio da homeostasia local, como lesões nos axônios, ocorre aquisição de múltiplas funções efetoras fagocíticas e a expressão de mediadores de moléculas (gliose) que permitem à microglia responder específica e adequadamente aos distúrbios (Figura 3) (ALOISI, 2001). A regulação adequada dessa resposta poderá deter a degeneração e promover crescimento neuronal ou, do contrário, irá maximizar a degeneração em curso (SCHWARTZ, 2003).

Figura 3 – Principais rotas de estimulação que causam microgliose.



Fonte: Hanisch, 2002, p. 143.

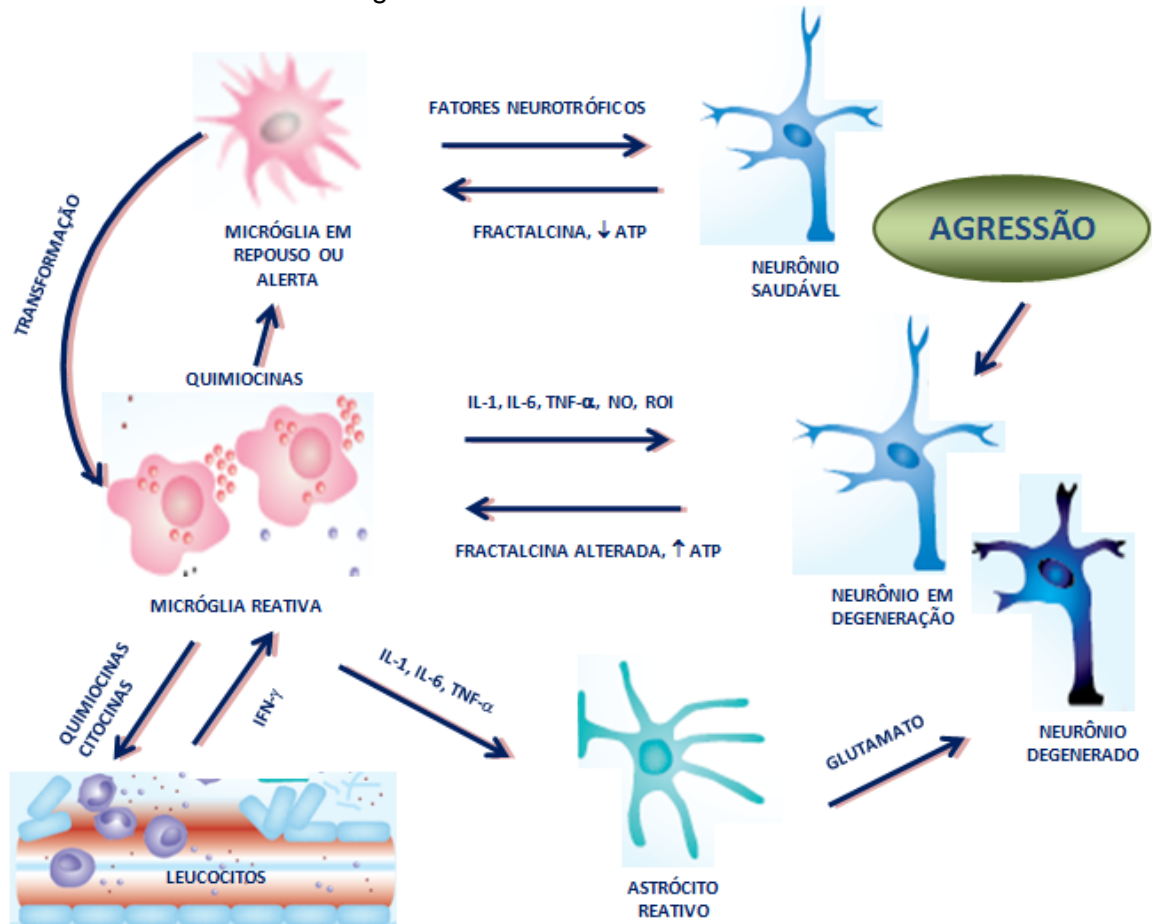
1.3 Resposta imune no sistema nervoso central

O SNC tem sido considerado um local imunologicamente privilegiado. E ele responde aos distúrbios locais, sejam estas de natureza infecciosa ou de outras etiologias. As células do sistema imune periférico possuem um acesso restrito a

este tecido, o que confere às células gliais residentes (astrócitos e microglia) a responsabilidade pela imunidade local. Essas células respondem às diversas formas de lesão, produzindo mediadores pro e anti-inflamatórios (LUCAS *et al.*, 2006). Quando as células do sistema imune entram no tecido nervoso, promovem profundas modificações na resposta glial, principalmente, da microglia e dos astrócitos, levando-as à adquirir novas competências imunológicas, destacando-se a de secreção de citocinas pró e antiinflamatórias e a intervenção nos processos de apresentação de antígenos (BENVENISTE, 1992).

Os mediadores inflamatórios são expressos em níveis indetectáveis ou muito baixos em tecido nervoso saudável. Entretanto, mediadores da inflamação são rapidamente induzidos como resposta a uma agressão tecidual, passando a exercer diversas ações. As citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores caracterizam o perfil de resposta T_H1 , possuindo papel essencial no desenvolvimento da inflamação do SNC com a indução da produção de quimiocinas e moléculas de adesão, recrutamento de células imunes do parênquima e ativação desses tipos celulares, bem como, ativação das próprias células gliais ou gliose (e.g.: Esquema 1) (BIBER *et al.*, 2001; ROTHWELL e LUHESHI, 2000).

Esquema 1 – Principais rotas de comunicação via citocinas e quimiocinas entre microglia e células residentes e invasoras.



Fonte: Hanisch, 2002, p. 143.

Entre os mediadores, interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 10 (IL-10) e óxido nítrico (NO) são de essencial importância para os eventos inflamatórios (BRADLEY, 2008; OGAWA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

O IFN- γ possui potentes efeitos imunomodulatórios, incluindo a ativação de fagócitos mononucleares e aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Quando quaisquer danos promovem uma ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), a concentração elevada de IFN- γ nas células da glia contribui para aumentar a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classes I e II, conferindo-lhes a capacidade de apresentação de antígenos (BENVENISTE, 1992).

O TNF é um dos mediadores centrais da inflamação tecidual e está implicado na patogênese de muitas alterações neurológicas. Esta citocina pode ter efeitos tanto deletérios, quanto protetores sobre os neurônios. A microglia é

capaz de produzir TNF, que parece atuar como um estímulo pró-inflamatório na fase aguda da resposta inflamatória local (LUCAS *et al.*, 2006). O TNF também aumenta a permeabilidade de células endoteliais e a expressão de moléculas de adesão na superfície destas, o que por sua vez aumenta a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos, na face capilar.

No SNC a IL-10, atua de forma autócrina sobre a microglia, inibindo a secreção de mediadores pro-inflamatórios e a produção de ânions superóxido (SAWADA *et al.*, 1999). A secreção de IL-10 pelas células da microglia pode ser parte dos mecanismos envolvidos na homeostase no SNC durante a infecção por *T. gondii*, sendo observado que reduz o estresse oxidativo, ao promover uma regulação negativa na produção de NO quando a microglia é ativada por IFN- γ , e conseqüentemente, favorecendo a restauração do equilíbrio neuronal e atenuação da inflamação ou mesmo da sua cronicidade (BREDT e SNYDER, 1994; ROZENFELD *et al.*, 2003).

As ERO tem ação sobre a destruição de microrganismos, parasitos e células tumorais (DUSSE *et al.*, 2003) e podem ser produzidos frente a uma variedade de antígenos e com isso, a sua síntese pode ser excessiva, tornando-se neurotóxica (MURPHY *et al.*, 1993). Em astrócitos, a síntese do NO pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β e IFN- γ .

A microglia representa uma população de células altamente reativas intraparenquimatosa do SNC as quais respondem a estímulos inflamatórios e infecciosos pela regulação positiva de moléculas envolvidas no controle da reatividade imune (ALOISI, 2001). A microglia é capaz de secretar substâncias pró-inflamatórias (IL-1, TNF), anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β), mediadores (PGE₂, NO) bem como quimiocinas envolvidas no recrutamento de leucócitos, além de poder maturar células como macrófagos para o mesmo fim (ALOISI, 2001). A regulação positiva do MHC classe II e moléculas de adesão/co-estimulatórias (CD11a, CD40, CD54, CD80 e CD86) na microglia ativada no curso das doenças imunomediadas do SNC, sugere que este tipo de célula pode adquirir a função de célula apresentadora de antígeno (APC) e desempenham um papel na reestimulação de células T (ALOISI, 2001).

Em relação aos mediadores imunorregulatórios lançados pela microglia durante a interação antígeno/células T auxiliaadoras, Aloisi *et al.*, (1999) sugeriram que o equilíbrio entre a secreção de IL-12 e PGE₂ pode estar envolvido na

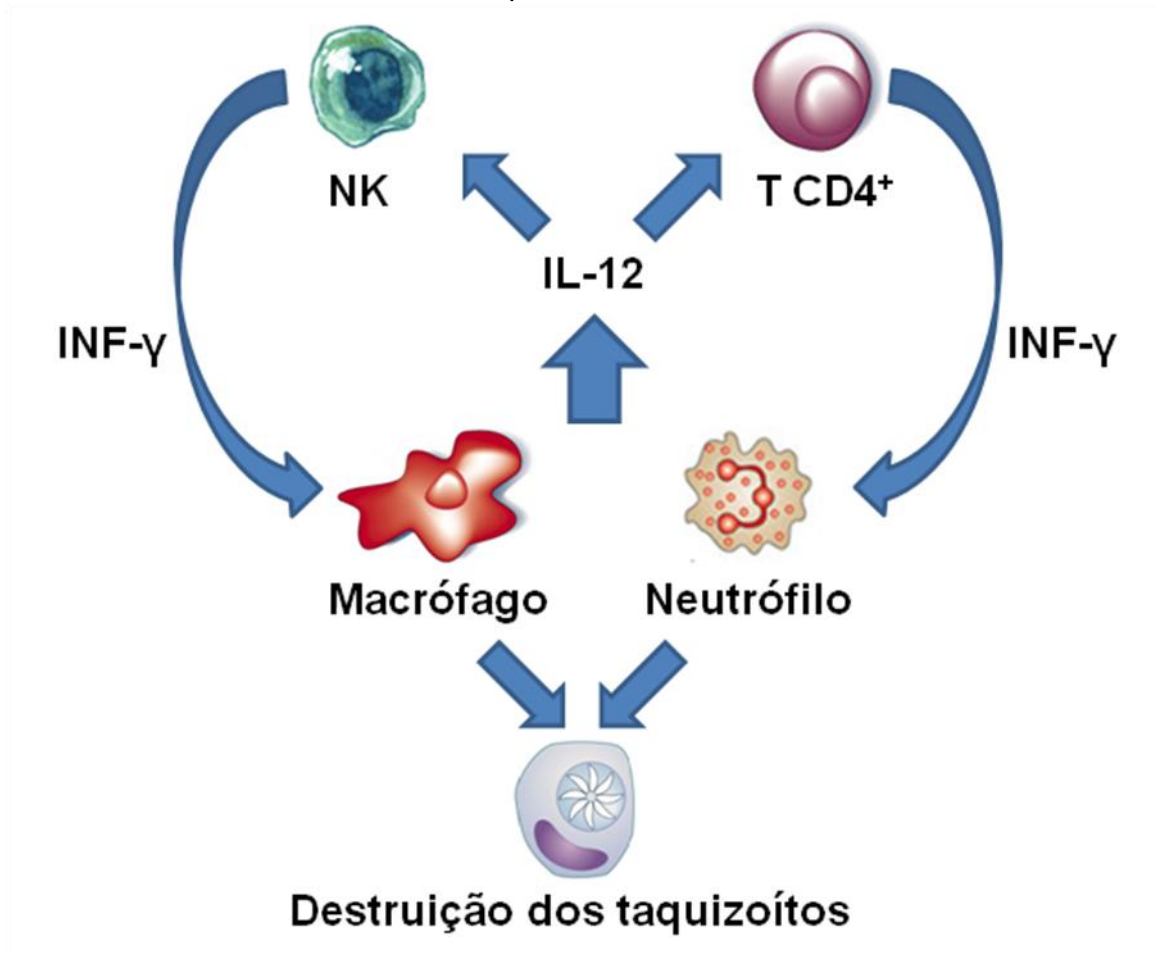
regulação das respostas T_H1 no SNC, e que a produção inicial de IL-12 poderia ser importante para a mudança para perfil T_H1 de resposta, enquanto que a secreção PGE₂ poderia representar um mecanismo de retroalimentação negativa da função APC e inibição da entrada de células T recrutadas na via T_H1. O que exemplifica a estreita comunicação entre mecanismos pró e anti-inflamatórios.

Devido o fato de um dado estímulo/distúrbio obter uma resposta específica que abarca apenas um subconjunto desses mediadores funcionais e moleculares, a microglia tem o potencial de desempenhar, desde funções neuroprotetoras, pró-regenerativas e de aumento da vigilância imune, até pró-inflamatórias e neurotóxicas. Porém é necessário elucidar quais os sinais e mediadores que determinam se a função dessas células será neurotrófica ou neurotóxica em estados inflamatórios.

1.4 Resposta imune na infecção por *Neospora caninum*

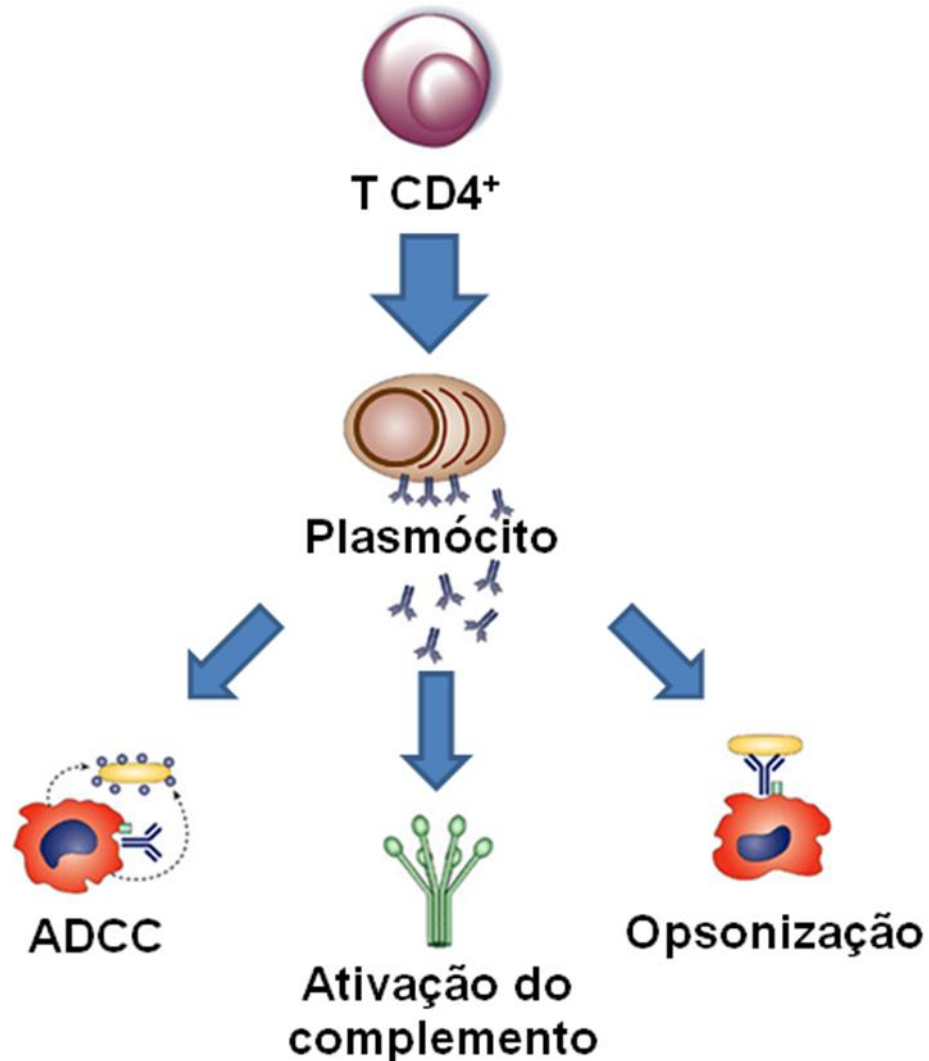
A resposta imune inata do hospedeiro ao *N. caninum* parece ser mediada por células *natural killers* (NK) (HEMPHILL *et al.*, 2006). Sua resposta adquirida, predominantemente, do tipo inflamatória, com produção de IL-12 e IFN- γ e com envolvimento das células T CD4⁺ (esquema 2) (KHAN *et al.*, 1997). Numa resposta mais tardia sua resposta humoral é mediada por anticorpos específicos que destroem taquizoítos na presença do complemento, dificultando a sua penetração nas células teciduais e também por mecanismo como citotoxicidade celular dependente de antígeno e opsonização (esquema 3) (MARKS *et al.*, 1998).

Esquema 2 – Mecanismo de resposta imune que atuam contra taquizoítos de *Neospora caninum*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Esquema 3 – Mecanismo de resposta imune adquirida (humoral) que atuam contra taquizoítos de *Neospora caninum*.



Fonte: Elaborada pelo autor

Quando a neosporose bovina cursa em paralelo à gestação, observa-se uma interação dinâmica entre o parasito e seu hospedeiro, especialmente entre a resposta imune materna. No curso da gestação, citocinas de perfil regulatório como IL-10, IL-4 e TGF- β , superpõem-se a citocinas de perfil inflamatório, atenuando a resposta inflamatória e impedindo a lesão tecidual, ao mesmo tempo que permitem uma proliferação por parte do parasito que não mais impedida pela imunidade local (DUBEY *et al.*, 2006).

Na imunidade adquirida, dois mecanismos são considerados: no estágio inicial da infecção, o IFN- γ , produzido por células T, ativa macrófagos, promovendo a destruição dos parasitos intracelulares (esquema 2); e no estágio tardio da infecção, células T CD4+ auxiliam na produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum*, que induzem mecanismos de proteção como citotoxicidade

celular dependente de anticorpo e opsonização (esquema 3) (TANAKA *et al.*, 2000).

Citocinas como IFN- γ e TNF, podem desempenhar um papel importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro em infecções por *N. caninum* (YAMANE *et al.*, 2000). Dados experimentais indicam que a liberação de IFN- γ e IL-12, seja responsável pela proteção do hospedeiro à infecção pelo *N. caninum* (esquema 2) (KHAN *et al.*, 1997). A importância do IFN- γ durante infecção por *N. caninum* já havia sido confirmada através de estudos que observaram alta susceptibilidade à infecção com taquizoítos de *N. caninum*, de camundongos *knockout* para IFN- γ e de camundongos que haviam sido tratados com anticorpo contra o IFN- γ (DUBEY e LINDSAY, 1996; KHAN *et al.*, 1997). O seu efeito inibidor sobre a multiplicação de parasitos foi observado quando culturas primárias de neurônios bovinos infectados com taquizoítos de *N. caninum*, foram tratadas com IFN- γ e TNF, segundo Yamane *et al.* (2000).

Pinheiro *et al.* (2006) verificaram que culturas primárias de astrócitos de ratos infectados por *N. caninum* respondem com a produção de altos níveis de IL-10, 24 e 72h pós-infecção, o que sugere um papel de mensageiro autócrino e/ou parácrino dessa citocina no micro ambiente celular, durante as primeiras horas após a infecção, quando também se verificou liberação acentuada de IL-6 (PINHEIRO *et al.*, 2010). Isso sugere uma ação protetora neuronal pelos astrócitos criando um ambiente imunologicamente privilegiado no SNC. Simultaneamente, os valores de TNF e ON encontrados neste estudo podem indicar mecanismo de resposta imune contra os taquizoítos de *N. caninum*, uma vez que ambos contribuíram anteriormente para reduzir o número de taquizoítos de *N. caninum* em culturas de cérebro de bovinos (YAMANE *et al.*, 2000).

Adicionalmente, Pinheiro *et al.*, (2006, 2010) demonstraram que a presença do parasito provocou significativa agressão às culturas de astrócitos o que foi evidenciado através da mensuração da atividade da lactato desidrogenase, causando também, sensíveis alterações morfológicas, características de astrogliose, o que se confirmou através do aumento da expressão de CD11b e GFAP – marcadores específicos para microglia e astrócitos, respectivamente.

Mais recentemente, Jesus *et al.* (2013) apontaram que tratamento com citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ ou TNF) ou depleção de citocinas regulatórias (IL-10 ou TGF- β) promovem o controle da proliferação de taquizoítos de *Neospora*

caninum em culturas de células da glia infectadas, sem promover perda da viabilidade celular. Jesus (2011) também observou que, em co-culturas de neurônio/glia infectadas, estímulos inflamatórios (IFN- γ ou LPS) embora promovam redução da viabilidade celular, atuam controlando a proliferação parasitária; suscitando mecanismos de controle da infecção e de preservação da integridade neuronal.

Sabe-se que no tecido nervoso, durante uma resposta inflamatória ao *N. caninum* ocorre à produção de fator de crescimento neuronal. Esse efeito parece ser mediado por ação direta das células imune, que aumentam a produção de IL-10 e diminuem a produção de IFN- γ . Isso poderia representar um papel protetor da glia, frente aos efeitos deletérios de IFN- γ no SNC, com vistas à preservação neuronal (BRACCI-LAUDIERO, 2010).

Esses dados reforçam a hipótese de que existe uma importante comunicação entre os tipos celulares estudados, por liberação de citocinas pró e antiinflamatórias, numa tentativa de debelar a infecção do SNC por *N. caninum* e que o padrão de resposta imune em que há inibição da resposta pró-inflamatória, poderia preservar a função do tecido nervoso, porém, também garantiria a sobrevivência do parasito.

2. JUSTIFICATIVA

A resposta imune do tecido nervoso à infecção por taquizoítos de *N. caninum* tem perfil antiinflamatório.

Além dos neurônios, o tecido nervoso é composto de diferentes tipos celulares, destacando-se majoritariamente as células gliais. Estas desempenham relevantes papéis na manutenção do equilíbrio homeostático e na resposta imune no sistema nervoso. Observações preliminares utilizando culturas primárias de células gliais trouxeram informações para a compreensão da resposta imune do SNC à neosporose. Verificou-se, por exemplo, que astrócitos de ratos cultivados *in vitro* quando infectados por taquizoítos de *N. caninum*, liberam citocinas regulatórias (PINHEIRO *et al.*, 2006). Também foi verificado que culturas mistas (astrócitos e microglia) quando moduladas com citocinas inflamatórias TNF e IFN- γ , controlavam a proliferação parasitária, traduzida pela redução do número de taquizoítos em cultura. Adicionalmente, foi identificado que células da glia infectadas pelo coccídeo apresentaram redução na produção de ON, sendo esta inibição potencializada após estímulo celular com IFN- γ , o que poderia representar um mecanismo de escape do parasito. No entanto, os dados da literatura que demonstram a resposta imune do tecido nervoso frente à neosporose ainda são incipientes, especialmente quanto aos papéis exercidos por diferentes fenótipos celulares nesta resposta, a exemplo, da resposta da microglia à infecção sem a presença (ou sem está sob a influência) de astrócitos e neurônios.

A microglia representa uma população de células altamente reativas do SNC, que respondem a estímulos inflamatórios e infecciosos pela regulação positiva de várias moléculas envolvidas no controle da reatividade imune. Temos como hipótese que quando o tecido nervoso é infectado por taquizoítos de *N. caninum*, as células microgliais desenvolvem padrão de resposta do tipo inflamatório com liberação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo assim para uma inibição da multiplicação dos taquizoítos, ao passo que promovem também uma maior lesão tecidual no sítio de infecção. A resposta da microglia à infecção também poderia estimular a liberação tardia de citocinas com perfil regulatório no tecido nervoso, o que por sua vez seria capaz de produzir retro-regulação negativa da ativação microglial. Em consequência, mecanismos antiinflamatório e

regulatório seriam capazes de evitar lesão do SNC.

Neste contexto, buscou-se investigar a resposta de culturas isoladas de microglia contra taquizoítos de *N. caninum*, para esclarecer qual o papel deste tipo celular durante a infecção. O perfil de resposta inerente à microglia, comparado àqueles obtidos em outros modelos de cultura de células do tecido nervoso, poderá contribuir para enriquecer mecanismos de diálogo dessas células durante agressões e, sobretudo, melhor compreender aspectos da imunopatogênese da neosporose no SNC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar resposta imune da microglia na infecção por *N. caninum in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer o modelo de cultura primária de microglia infectada por *N. caninum*;
- Avaliar os índices de viabilidade celular em cultura de microglia infectadas por *N. caninum*;
- Investigar a produção das citocinas IFN- γ , TNF e IL-10 em culturas de microglia infectadas por *N. caninum*;
- Mensurar a produção do mediador NO em cultura de microglia infectadas por *N. caninum*.

4. RESULTADOS

Manuscrito – Efeito *in vitro* da infecção por taquizoítos de *N. caninum* sobre microglia de córtex cerebral de ratos neonatos.

Efeito *in vitro* da infecção por taquizoítos de *N. caninum* sobre microglia de córtex cerebral de ratos neonatos.

Ferraz, G. A.^{1*}; Almeida, I. C. G. B.¹; Arruda, M. R.¹; Jesus, L. B.¹; Santos, A. B.¹;
Jesus, E .E. V.¹; Ribeiro, C. S. O.¹; Pinheiro, A. M.²; Costa, M. F. D.¹

¹ Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, CEP 41100-100, Salvador, Bahia, Brasil.

² Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. Campus da Universidade, CEP 44380-000 - Cruz das Almas, Bahia, Brasil

* Autor correspondente: Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, CEP 41110-100, Salvador, Bahia, Brasil. Tel: 55 71 92727214 / 88218091. E-mail: ferraz_gregory@yahoo.com.br

Resumo

A neosporose acomete muitas espécies animais, causando-lhes manifestações clínicas de natureza neuro muscular e tem sido apontada como um dos fatores que acarreta prejuízos econômicos na pecuária mundial. Seu agente etiológico, o *N. caninum*, é controlado por mecanismos de imunidade mediada por células, com destaque de papel protetor para os linfócitos T, que tem variação na sua resposta a depender do tecido parasitado. No sistema nervoso central ocorre um balanço imunológico muito preciso onde a forma infectante do parasito - os taquizoítos - estimula a produção de citocinas do tipo TH1, que acarretariam no controle da sua proliferação. Neste tecido, as células neurogliais parecem responder com a produção de citocinas TH2, com intuito de evitar ou controlar lesões causadas pela resposta pró-inflamatória. O presente estudo investigou o papel imunomodulatório das culturas primárias de microglia durante infecção com taquizoítos de *N. caninum*. As células, obtidas de cérebro de ratos neonatos, foram infectadas por 72h com o parasito e, para obtenção de controle positivo, foram tratadas com LPS pelo mesmo período. Ensaios de Azul de Trypan e MTT foram realizados para testar a viabilidade celular. Foi observado que as células infectadas e aquelas tratadas com LPS apresentaram significativa perda de viabilidade, cuja causa pode ter sido o aumento significativo dos níveis de nitrito, contudo este evento não contribuiu para o controle da proliferação parasitária. A resposta dessas células ao estímulo parasitário não acarretou tampouco liberação de citocinas inflamatórias (TNF e IFN- γ) e somente quando

pré-tratadas com LPS, tiveram níveis de TNF aumentados. Esses dados são compatíveis com a possível modulação negativa da citocina IL-10, que foi encontrada aumentada em ambos tratamentos. Os resultados apontam para a incapacidade das células microgliais isoladas em controlar a proliferação de taquizoítos, ainda que estas, em interação com demais tipos celulares no contexto do tecido cerebral, tenham papel destacado na modulação da resposta ao *N. caninum*.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, microglia, resposta imune.

1. Introdução

O *Neospora caninum* é um parasito apicomplexa intracelular obrigatório que causa a neosporose (DUBEY *et al.*, 2002). Ele infecta um amplo espectro de animais, mais significativamente em bovinos e canídeos, sendo umas das causas de aborto em vacas (DUBEY e SCHARES, 2011).

Na placenta de mamíferos mecanismos imunológicos complexos, precisos e balanceados são deflagrados pela presença desse parasito. Citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β predominam, enquanto citocinas como IL-1, 12, IFN- γ e TNF estão restritas, pois podem levar ao aborto (DUBEY *et al.*, 2006). Porém esse perfil de resposta regulatório favorece a proliferação do *N. caninum* para a corrente sanguínea do feto e outros tecidos, com predileção para o sistema nervoso central (SNC) (HEMPHILL *et al.*, 2006), onde pode encistar-se na forma de bradizoítos que se multiplicam lentamente, desencadeando uma infecção quiescente e persistente, mantida sob vigilância pela imunidade do hospedeiro (HEMPHILL *et al.*, 2006). Quando na forma infectante de taquizoítos, eles se multiplicam rapidamente, desenvolvendo lesões pela ruptura das células. Portanto, a doença, depende de um equilíbrio entre o desenvolvimento dos taquizoítos e a capacidade do hospedeiro de inibir sua multiplicação parasitária.

Pinheiro *et al.* (2006a) demonstraram em culturas primárias de astrócitos de ratos infectadas com taquizoítos de *N. caninum*, que houve um decréscimo da viabilidade celular, além do aumento de TNF, NO e IL-10. Em 2010, Pinheiro e colaboradores, trabalhando com infecção de células mistas (astrócitos e microglia) por *N. caninum* demonstraram que houve decréscimo do número de taquizoítos, apontando como principais fatores para esse controle a produção de estímulos inflamatórios, como TNF, IL-6 e NO, além de apontar o aumento da produção de IL-10, como uma tentativa de proteção celular que não foi, porém, suficiente para evitar lesões nas células já que foi verificada perda significativa de viabilidade. Complementarmente, Santos (2010),

demonstrou no mesmo sistema o aumento de IFN- γ , NO, IL-10 e TGF- β revelando informações adicionais na regulação da resposta glial contra o parasito.

Para verificar o papel específico dos diversos estímulos citados, Jesus *et al.*, (2013) realizaram um estudo com células mistas que apontou tanto o tratamento com citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF), quanto à depleção de citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β) como mecanismos de controle da proliferação de taquizoítos, sem eventual perda de viabilidade, dado esse confirmado em parte por estudo anteriores com neurônios bovinos (YAMANE *et al.*, 2000).

Elevando ainda mais a complexidade desse sistema, Jesus (2011), trabalhando com co-cultura (microglia, astrócito e neurônio) demonstraram que após infecção por *N. caninum* não houve diminuição na viabilidade celular, assim como a falta de estímulos inflamatórios (TNF e NO) e o aumento de estímulos regulatórios (IL-10 e PGE₂).

Dentre as células da neuroglia, a microglia parece servir como sensor patológico primário e se torna ativada em resposta a estímulos lesivos (LI *et al.*, 2007). As células microgliais representam populações residentes de macrófagos no parênquima do SNC, sendo responsáveis pela resposta imune inata, sendo capaz de reconhecer uma variedade de patógenos que colonizam o tecido nervoso. Tal reconhecimento se deve aos receptores de reconhecimento padrão que reconhecem padrões microbianos altamente conservados, nomeados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (MARIANI e KIELIAN, 2009).

A ligação dos PAMP aos receptores tipo *toll* da microglia, libera um amplo espectro de mediadores pró-inflamatórios incluindo intermediários reativos de oxigênio/nitrogênio, citocinas e quimiocinas nas células ativadas, além de aumentar níveis de fagocitose (TAMBUYZER *et al.*, 2009). Sendo assim, uma vez ativadas, essas células parecem inibir o crescimento do parasito, o que reforça seu papel efetor na prevenção da proliferação de taquizoítos no SNC (MARIANI e KIELIAN, 2009). No entanto, um estreito mecanismo regulatório deve estar presente para prevenir que essa resposta se torne patológica e induzam lesões nos tecidos circundantes.

O objetivo do presente estudo foi entender a resposta imune de culturas primárias de microglia na infecção por taquizoítos de *N. caninum*, avaliando para isso parâmetros como: mudanças morfológicas; proliferação parasitária; viabilidade celular (MTT e Azul de Trypan); liberação de óxido nítrico; e secreção de citocinas inflamatórias (INF- γ e TNF); e antiinflamatórias (IL-10).

2. Materiais e métodos

2.1. Cultura de microglia

As culturas de células da microglia foram obtidas de córtex cerebral de ratos neonatos (<48h de idade), por protocolo modificado de Lima *et al.*, (2001). Resumidamente, a meninge foi cuidadosamente removida, com auxílio de estereomicroscópio (Labomed, EUA) e os hemisférios cerebrais dissecados. As células foram então submetidas à dissociação mecânica e plaqueadas em garrafas de cultura de 75 cm² de área (TPP, Suíça) contendo meio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12) (Gibco, EUA), suplementado com glicose (33 mM) (Isofarma, Brasil), glutamina (2 mM) (Acrós Organics, EUA), bicarbonato de sódio (3 mM) (Reagen, Brasil), penicilina/estreptomicina (0,5 mg/ml) (Gibco, EUA), e 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, EUA). As garrafas foram então mantidas em estufa a 37°C, com saturação do CO₂ à 5%.

Após seis dias de cultura realizou-se a troca de 50% do meio e no 12º dia de cultivo todo volume de meio foi substituído. No dia seguinte, as garrafas de cultura foram submetidas à agitação, (agitador Cientec, Brasil) a 230 rpm durante 180 minutos para que as células microgliais se destacassem da monocamada de astrócitos. As células ressuspendidas no sobrenadante foram recolhidas, centrifugadas (Hettich, Alemanha) a 2504G / 4°C durante oito minutos e a seguir, ressuspendidas, quantificadas com auxílio da câmara de Neubauer (Inlab, Brasil) e replaqueadas na densidade de 1x10⁵, 5x10⁴, 3x10⁴ células, respectivamente, por poço de placa de cultura de seis (em 2 mL de meio de cultura), vinte e quatro (em 500µL de meio de cultura) ou noventa e seis poços (com 200µL de meio de cultura) (TPP, Suíça). As células foram cultivadas até confluência (três-cinco dias), quando então foram submetidas aos protocolos experimentais, antes dos tratamentos foi realizada a contagem do número de células (em alíquota de 20µL) na câmara de Neubauer (Inlab, Brasil), para posterior infecção fidedigna de uma célula para um taquizoíto.

2.2. Cultura de *Neospora caninum*

Taquizoítos da cepa de *N. caninum* (NC-1) foram cultivados em monocamada de células Vero com meio RPMI (Gibco, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, EUA) e penicilina/estreptomicina (0,5 mg/ml), com trocas regulares do meio a cada 48 horas. Quando observado o início da destruição da monocamada celular pelo efeito citopático do parasito, a cultura foi raspada (TPP, Suíça), o meio foi coletado

com auxílio de seringa 5mL (BD, EUA) e agulha 22G (BD, EUA), para que através de três passagens o restante de células Vero fossem lisadas, liberando assim os taquizoítos para posterior isolamento através de filtro de 5,0 µm (Millex, EUA) (GONDIM *et al.*, 2004).

2.3. Infecção e tratamento das células em cultura

Os parasitos foram quantificados por contagem (em alíquota de 20µL) na câmara de Neubauer (Inlab, Brasil) e utilizados para infecção das culturas de células da microglia com razão célula/parasito de 1:1, por 72h. O tempo e a taxa de infecção foram escolhidos porque provaram ser a melhor condição experimental para o estudo como determinado por testes preliminares com 24, 48, 72 e 96h de infecção e taxa de infecção de 1:2, 1:1 e 2:1 (dados não mostrados).

Para obtenção de um controle de estímulo pró-inflamatório, as culturas foram tratadas com lipossacarídeo (LPS) (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com Xin *et al.*, (2011) e mantidas pelo mesmo tempo das culturas infectadas com taquizoítos.

2.4. Análises morfológicas

Contraste de fase: Mudanças morfológicas da cultura de microglia foram inicialmente avaliadas por meio de fotografias realizadas em microscópio de contraste de fase (Nikon, Japão), após 72h de infecção/tratamento. Para isso, as placas de cultura foram retiradas da estufa uma hora antes da parada do experimento e todos os poços controle/infectado/LPS foram fotografados em objetiva de 20X. Após esse processo, os sobrenadantes das culturas foram coletados em microtubos de 2mL (Axygen, EUA) e seguiram para o freezer -70°C (Coldlab, Brasil) até os procedimentos de mensuração de citocinas. As placas de cultura foram lavadas três vezes com PBS, fixadas por 20 minutos com metanol a -20°C e mantidas a -20°C até os procedimentos experimentais de imunocitoquímica. Foram realizados três experimentos independentes com mínimo de seis fotos para infecção e controle e dois experimentos independentes com mínimo de seis fotos para LPS.

Imunocitoquímica: A identificação de microglia foi realizada, por imunomarcção com anticorpo OX-42. Resumidamente, as lamínulas com as células foram hidratadas por 30 minutos em PBS e depois, na etapa de permeabilização, adicionou-se PBS+Tween 80 0,2% (Vetec, Brasil) por nove minutos. Quando então seguiu a etapa de bloqueio, adicionando PBS+SFB 10% (Gibco, EUA), durante 30 minutos. Logo após, as células foram incubadas com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-CD11b (Santa Cruz Biotechnology, EUA) (1:500 em PBS), *overnight*, à temperatura de 4°C em câmara

úmida. Então, as células foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo (Invitrogen, EUA) (1:400 em PBS). Co-marcação foi realizada com anticorpo primário policlonal de coelho anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology, EUA) (1:200 em PBS) e anticorpo secundário de cabra anti-coelho (Invitrogen, EUA) (1:400 em PBS) para certificar a pureza da cultura. Além disso, foi realizada a marcação do núcleo através do corante Hoechst (5µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente, as culturas foram analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Japão), usando uma câmera digital (Media Cybernetics, EUA) em objetiva de 20X. A pureza das culturas foi determinada por contagem dos núcleos e suas respectivas células sobrepostas (OX-42 ou GFAP). Foram realizados três experimentos independentes com dez fotos para infecção e controle e dois experimentos independentes com dez fotos para LPS.

2.5. Ensaio de proliferação parasitária

A determinação da proliferação do parasito foi realizada pela contagem do número de taquizoítos presentes após 72h de infecção em cada cultura. Poços da cultura infectados foram raspados e as células rompidas por três passagens em seringa 5mL (BD, EUA) e agulha 22G (BD, EUA). E através de alíquotas de 20µL os taquizoítos foram então contados usando câmara de Neubauer (Inlab, Brasil), como descrito por Yamane *et al.* (2000). Os resultados foram expressos em quantidade de taquizoítos comparado ao momento da infecção (0h). E foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

2.6. Avaliação da viabilidade celular

Azul de Tripán: A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão Azul de Tripán, modificado de Longo-Sorbello *et al.*, (2006). Resumidamente, após 72h de infecção ou tratamento, as células foram ressuspensas com auxílio de tripsina (Gibco, EUA), após verificação do desprendimento das células, via microscópio de contraste de fase (Nikon, Japão), acrescentou-se meio de cultura DMEM-F12 (Gibco, EUA) para que esse diminuísse o efeito citopático da tripsina sobre as células e então as células foram coletadas. Lavaram-se os poços das placas de cultura com PBS (Gibco, EUA) para capturar resquícios de células e novamente coletou-as, quando então passaram por centrifugação e posteriormente, resuspensão em solução de Azul de Trypan (0,4%), por cinco minutos. Por fim, as células foram contadas em câmara de Neubauer (Inlab, Brasil). Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao total de células. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata para infecção e dois experimentos independentes em triplicata para LPS.

Análise colorimétrica do tetrazólio de dimetiltiazol: Após 72h de infecção/tratamento foi retirado o meio DMEM-F12 (Gibco, EUA) das culturas e acrescentando solução de MTT (100 μ L) numa concentração final de 1mg/mL, duas horas antes do término do tempo de infecção/tratamento. Após esse período as células foram lisadas pela adição de 100 μ L de SDS 20% (pH 4,7) e as placas foram mantidas *overnight* a temperatura ambiente para que fossem dissolvidos os cristais de formazan. A densidade óptica foi mensurada através de leitor de placa (Biorad, Japão) a 595nm. Os resultados foram expressos em porcentagem do metabolismo mitocondrial comparado ao controle, e o metabolismo mitocondrial das células controle foi considerado 100%. Foram realizados três experimentos independentes com mínimo de oito replicatas para infecção e tratamento com LPS.

2.7. Mensuração da produção de NO

Os sobrenadantes da cultura de microglia foram testados para determinar os níveis de nitrito, que refletem a produção de NO, usando um teste colorimétrico baseado no método de Griess (SANTOS, 2010). Resumidamente, 50 μ L dos sobrenadantes foram incubados por 15 minutos numa solução de igual volume à 1:1 (v/v) de 1% de sulfanilamida e 0,1% de naftil etilenodiamina dicloridrato, em temperatura ambiente e sua absorção foi medida em 490nm, usando um leitor de placa (Biorad, Japão).

As concentrações de nitrito dos tratamentos foram calculadas por comparação com as concentrações seriadas do nitrito de sódio (NaNO₂: 1.26-100 nM). E foram realizados três experimentos independentes com mínimo de seis replicatas para infecção e dois experimentos independentes com mínimo de seis replicatas para LPS.

2.8. Mensuração das citocinas

Os sobrenadantes das culturas controle/infectada/tratada (100 μ L) foram testados quanto à presença de IFN- γ , TNF e IL-10 por testes ELISA sanduíche (R&D Systems, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL (média e desvio padrão). E foram realizados três experimentos independentes com mínimo de seis replicatas para infecção e dois experimentos independentes com mínimo de seis replicatas para LPS.

2.9. Análise estatística

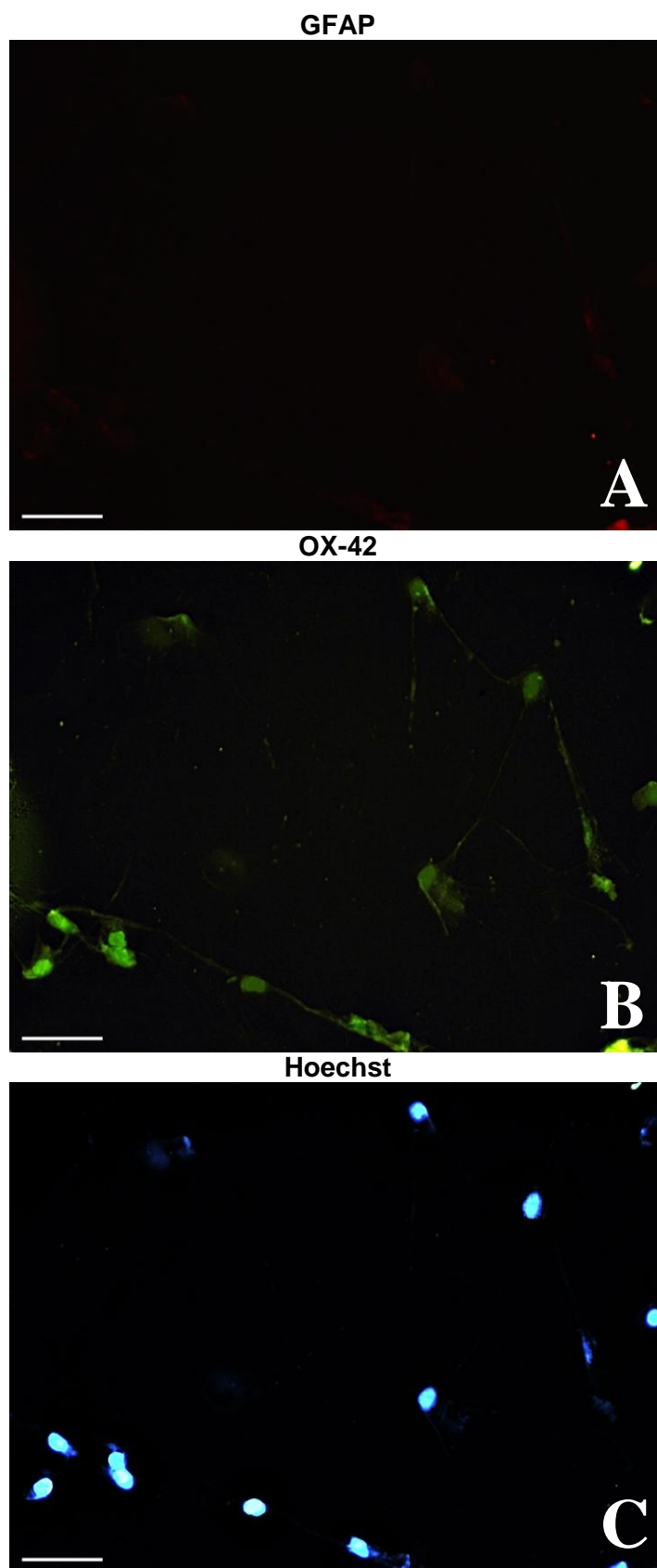
Os dados foram analisados para a normalidade da distribuição utilizando teste de D'Agostino & Pearson. Os experimentos independentes foram comparados entre si empregando teste ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis na dependência da distribuição. A comparação entre os diferentes grupos foi realizada utilizando teste Mann–Whitney, através de programa GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, Inc.). Os valores de probabilidade de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

3. Resultados

3.1. Análises morfológicas

Por meio de contagem dos núcleos e suas respectivas células sobrepostas, foi observado que cerca de 99% das células analisadas, por imunocitoquímica, estavam com expressão aumentada de OX-42 e não expressão de GFAP, indicando um enriquecimento muito elevado da microglia nas culturas (figura 1).

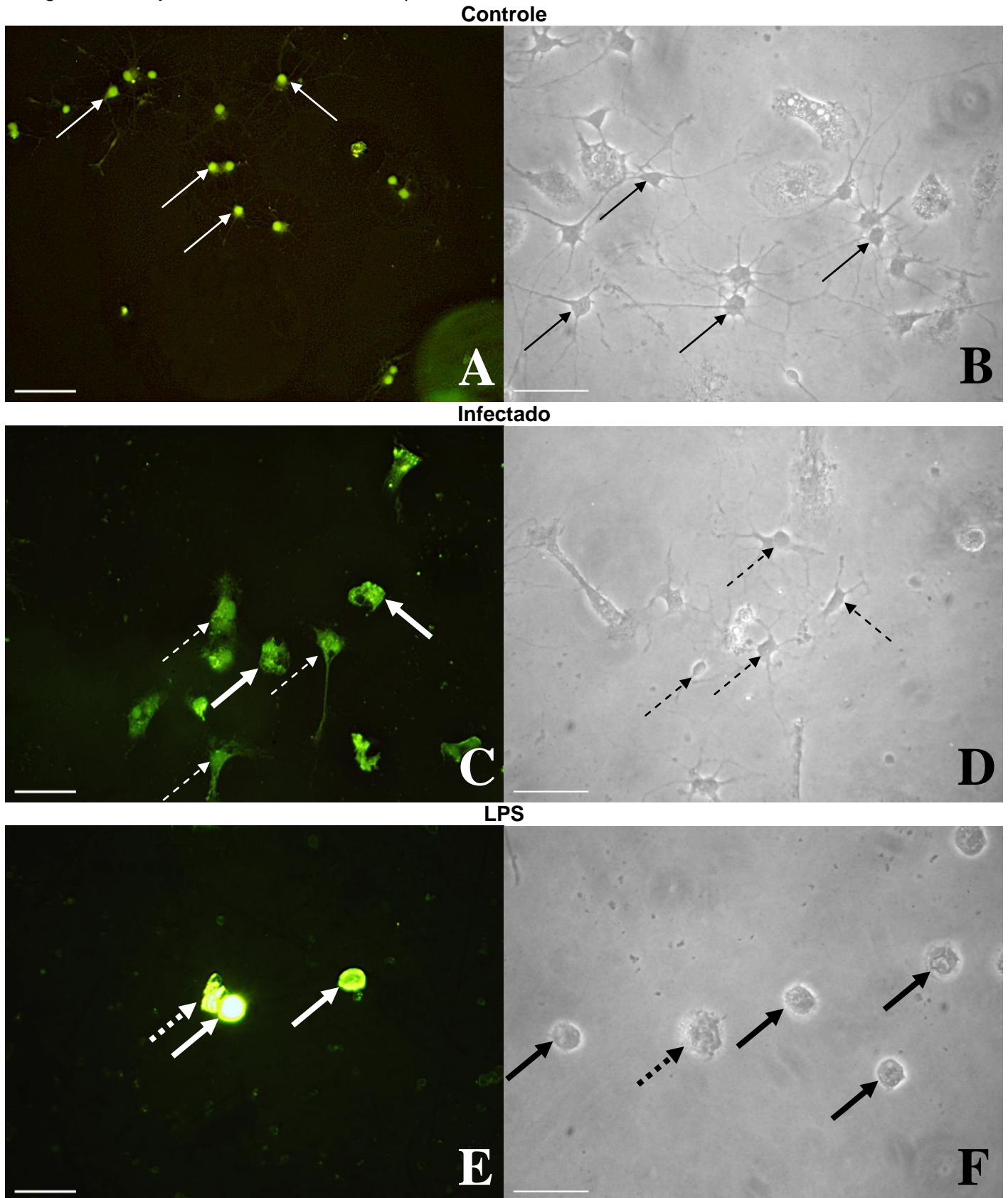
Figura 1. Imunodeteccção de GFAP e OX-42 em cultura de microglia, através de microscopia de fluorescência. Astrócitos aparecem em vermelho, microglia em verde e o núcleo em azul (coloração por Hoechst). **A:** Astrócitos. **B:** Microglia. **C:** Núcleo. Barra de escala = 50µm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Análises morfológicas por microscopia de contraste de fase e óptica revelaram que a cultura controle permaneceu em estado de vigília e repouso, mostrando ramificações características (figura 2 - seta). A cultura infectada sofreu mudanças morfológicas características da microglia fisiologicamente ativada em estado de alerta, com forma ameboide arredondada (figura 2 - seta grossa) e prolongamentos menores (figura 2 - seta tracejada). O tratamento com LPS também acarretou mudanças características de um estado ativado (figura 2 - seta grossa), acrescido de formato disforme (figura 2 - seta grossa tracejada).

Figura 2 – Microscopia de fluorescência (A, C e E) e de contraste de fase (B, D e F) das culturas de microglia controle, infectada com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratadas com LPS (10µg/mL), avaliadas 72h após infecção. **A-B**: Células controle mantidas em meio fresco exibiram um estado de viglância em repouso ramificado - seta. **C-D**: Infecção por *Neospora caninum* levou à mudança da microglia para um estado de alerta, com prolongamentos menores – seta tracejada – e fisiologicamente ativada, de forma ameboide arredondada – seta grossa. **E-F**: O tratamento com LPS levou à mudança da microglia para um estado fisiologicamente ativado, de forma ameboide arredondada e a um estado de formato disforme – seta grossa tracejada. Barra de escala = 50µm.

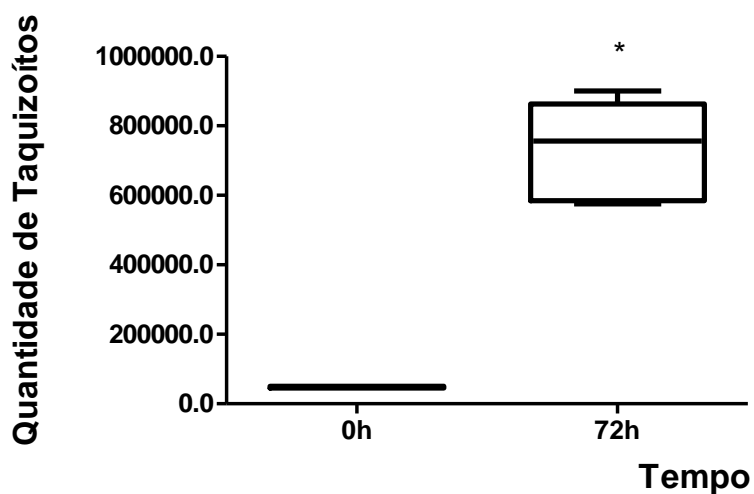


Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2. Determinação da proliferação do parasito

No teste de proliferação parasitária verificou-se um aumento de 1592% (15,9 vezes) no número de taquizoítos em cultura após as 72 horas da infecção, ou seja, de uma mediana de 47500 para 756250 taquizoítos (gráfico 1), havendo diferença estatística entre os momentos 0 e 72h.

Gráfico 1 – Quantidade de taquizoítos após 72 de infecção. Os resultados estão expressos em mediana e a amplitude interquartis da quantidade de taquizoítos em comparação ao início da infecção (0h). * representa diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação à 0h (Mann Whitney).

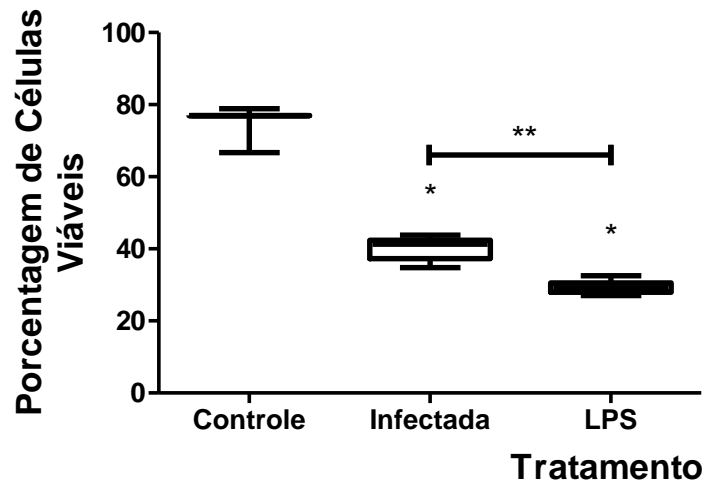


Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3. Avaliação da viabilidade celular

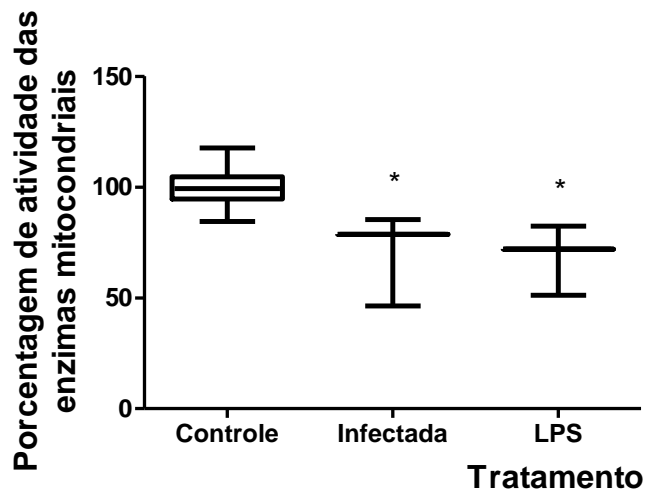
Pelo teste de exclusão de Azul de Trypan. Por este teste, a viabilidade celular nas culturas controle, infectadas e tratadas com LPS teve como mediana 76,95%, 41,31% e 29,25%, respectivamente (gráfico 2). Da mesma forma, o teste do MTT revelou neste mesmo parâmetro que a mediana da viabilidade para as culturas controle, infectadas e tratadas com LPS foi de 99,36%, 78,61% e 71,97%, respectivamente (gráfico 3).

Gráfico 2 – Viabilidade celular avaliada pelo teste de Azul de Tripán em células da microglia infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratadas com LPS (10µg/mL), avaliadas 72 horas pós-infecção. Os resultados estão expressos em mediana e a amplitude interquartis da porcentagem de células viáveis. * representa diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao controle. ** representa, diferença estatística entre os grupos (Mann Whitney).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 3 – Viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT em células da microglia infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratadas com LPS (10µg/mL), avaliadas 72 horas pós-infecção. Os resultados estão expressos em mediana e a amplitude interquartis da porcentagem de células sem dano mitocondrial em comparação ao controle, considerado 100%. * representa diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao controle (Mann Whitney).

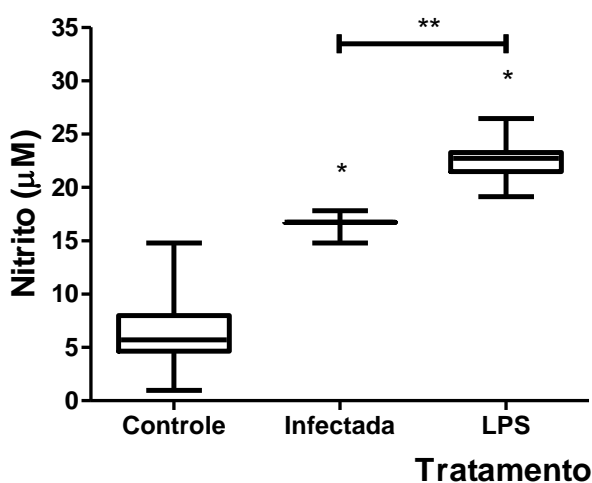


Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4. Determinação da produção de óxido nítrico

Neste estudo foi observada uma robusta produção de NO pelos grupos testados. A mediana dos níveis de nitrito detectados nos sobrenadantes das culturas controle, infectadas e tratadas com LPS foram de 5,7, 16,7 e 22,7 μM , respectivamente, o que representa um aumento de 292,9% (infectado) e 398,2% (LPS) quando comparado ao controle (gráfico 4).

Gráfico 4 – Níveis de nitrito no sobrenadante de células da microglia infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratadas com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), avaliadas 72 horas pós-infecção. Os resultados estão expressos em mediana e a amplitude interquartis. * representa diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao controle. ** representa, diferença estatística entre os grupos (Mann Whitney).



Fonte: Elaborada pelo autor.

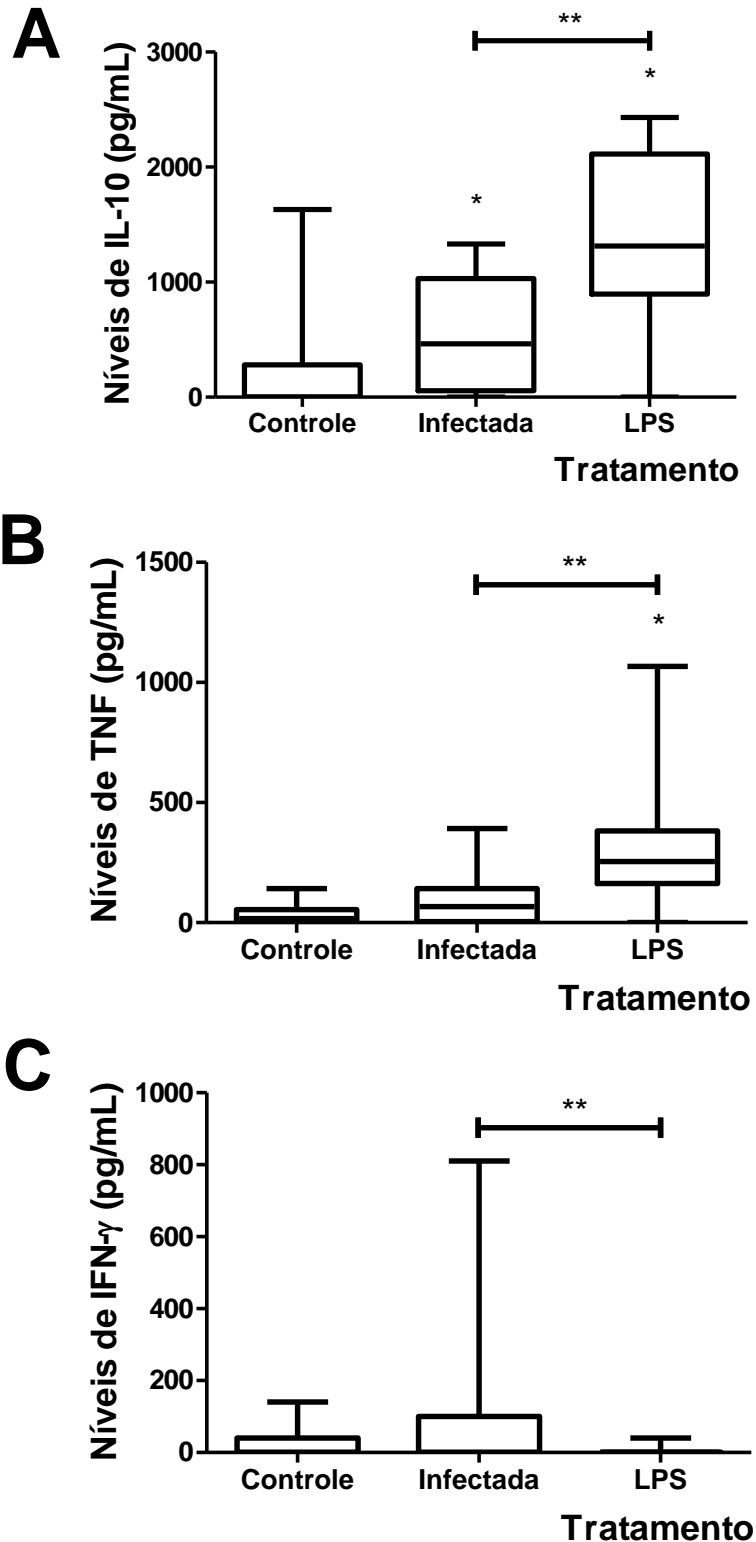
3.5. Determinação dos níveis de IL-10, TNF e INF- γ

Também foi observada a produção das citocinas IL-10, TNF e INF- γ pelos grupos testados. A mediana dos níveis de IL-10 detectados nos sobrenadantes das culturas controles, infectadas e tratadas com LPS foram 0,0, 463,3 e 1375,8 pg/mL , respectivamente, o que representa um aumento significativo para as culturas infectadas e tratadas com LPS quando comparadas ao controle (gráfico 5 – A).

No caso do TNF a mediana dos níveis detectados nos sobrenadantes das culturas controles, infectadas e tratadas com LPS foram 16,25, 66,25 e 253,8 pg/mL , respectivamente, o que representou um aumento apenas para o grupo tratado com LPS (1561,8%), quando comparado ao controle (gráfico 5 – B).

Já com o INF- γ , a mediana dos níveis detectados nos sobrenadantes das culturas controles, infectadas e tratadas com LPS foram 0,0, 0,0 e 0,0 pg/mL , respectivamente, o que não representou aumento nem diminuição para nenhum tratamento quando comparado ao controle (gráfico 5 – C).

Gráfico 5 – Níveis de IL-10 (A), TNF (B) e IFN- γ (C) no sobrenadante de células da microglia infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* (1:1) e tratada com LPS (10 μ g/mL), avaliadas 72 horas pós-infecção. Após esse período os sobrenadantes foram coletados e a concentração das citocinas foi dosada por kit ELISA. Os resultados estão expressos em mediana e a amplitude interquartis. * representa diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao controle. ** representa, diferença estatística entre os grupos (Mann Whitney).



Fonte: Elaborada pelo autor.

4. Discussão

Trabalhos experimentais anteriores, mostraram características da resposta inflamatória ao *N. caninum* em culturas primárias de astrócitos (PINHEIRO *et al.*, 2006a; 2006b), em culturas mistas de células gliais (JESUS *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2010; SANTOS, 2010) e em co-culturas (JESUS, 2011). Entretanto se tornou necessário entender que tipo de resposta é deflagrada pela microglia durante a infecção, sem a presença de astrócitos e neurônios. Neste contexto, buscou-se investigar a resposta de culturas isoladas de microglia contra taquizoítos de *N. caninum*, para tentar esclarecer qual o provável papel deste tipo celular na infecção por este parasito.

Primeiramente, foi investigado se uma vez infectas haveria ativação das células microglias que provocasse mudanças morfológicas. Foi observada a ocorrência dessas modificações tanto para a infecção quanto para o tratamento com LPS. Nas culturas controle, houve predominância de uma morfologia ramificada, com grandes prolongamentos, característica do estado de “repouso” da microglia cuja função é monitorar sinais do ambiente cerebral (DAVALOS *et al.*, 2005). E visto que a microglia se torna rapidamente ativada quando em resposta a distúrbio da homeostase do tecido ou estímulo experimental (HANISCH e KETTENMANN, 2007), verificamos que nas culturas infectadas com o *N. caninum*, a microglia retrai seus prolongamentos e reabsorve totalmente os mesmos, caracterizando assim a morfologia amebóide das células. Esse fenótipo foi encontrado predominantemente nas culturas tratadas com LPS.

Tendo em vista que as mudanças morfológicas da microglia são acompanhadas de múltiplas funções efetoras (VILHARDT, 2005) e que estas na infecção experimental por *T. gondii* inibiram a proliferação de taquizoítos (CHAO *et al.*, 1993; 1994), resolvemos investigar se as alterações morfológicas observadas nas células microgliais, resultariam em controle da proliferação dos taquizoítos de *N. caninum*.

Como resultado, foi observado que apesar da ativação microglial, ocorreu proliferação parasitária, com aumento significativo de 16 vezes o valor inicial de taquizoítos. Demonstrando que, a microgliose não foi suficiente para controlar a proliferação parasitária. Regidor-Cerrillo *et al.* (2011), trabalhando com infecção de linhagens celulares renais de macacos por diversas cepas de *N. caninum*, demonstraram que a taxa de proliferação (avaliada pela determinação do tempo de duplicação) variou de 9,8h à 14,1h entre as cepas de *N. caninum*. Ou seja, para que o número de taquizoítos aumentasse 15 vezes em 72h, o seu tempo de duplicação teria que ser de aproximadamente 18h, o que seria plausível com o estudo anterior, já que este aponta para diferenças intraespecíficas das cepas de *N. caninum* relacionadas com a eficiência

do processo de ciclo lítico (invasão e proliferação). Além disso, é importante lembrar que a diferença na multiplicação de taquizoítos pode ocorrer com base nas linhagens celulares hospedeiras utilizadas, como foi demonstrado em estudo anterior com *T. gondii* (DIAB e EL-BAHY, 2008). Com o domínio dessa informação, partimos para investigar se durante essa proliferação parasitária haveria perda na viabilidade celular.

Constatamos que, assim como esperado para o LPS, a infecção também reduz a viabilidade das células e isso foi confirmado por dois métodos distintos (MTT e Azul de Trypan). Essa redução também foi observada quando da infecção experimental de cultivos de células gliais mistas (PINHEIRO *et al.*, 2006b; 2010; SANTOS, 2010). Isso pode ser explicado pelo fato do *N. caninum* ser um parasito intracelular obrigatório (HEMPHILL *et al.*, 2006) que para sobreviver, precisa invadir, proliferar e sair das células do hospedeiro, completando assim seu ciclo lítico, bem como gerando morte e dano celular (HEMPHILL *et al.*, 2006; PLATTNER e SOLDATI-FAVRE, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

Valendo-nos do conhecimento de que a ativação da microglia também resulta na expressão de uma série de mediadores moleculares (VILHARDT, 2005), foi investigada a produção de NO e citocinas para buscar entender como estes poderiam atuar durante a infecção da microglia por *N. caninum*.

A investigação dos níveis de nitrito no sobrenadante mostrou que ocorre produção de NO em resposta a infecção e ao tratamento com LPS. Entretanto, pode-se supor que o controle da proliferação parasitária deve ser um mecanismo independente de NO. Assim como demonstrado por estudos com microglia de humanos (CHAO *et al.*, 1994) e de ratos (LUDER *et al.*, 1999) infectada com *T. gondii*, onde a liberação de NO após infecção não estava associada à inibição da replicação do patógeno, já que inibidores da óxido nítrico sintetase (NGMA e NGMA/L-NIL, respectivamente) não afetaram a atividade antitoxoplásmica mediada por citocinas da microglia.

Para explicarmos o aumento dos níveis de NO, nos baseamos em estudos que demonstram a eficácia de mediadores como LPS, IL-1 β , TNF e IFN- γ em estimular a expressão de iNOS em microglia e astrócitos (LU *et al.*, 2010; MURPHY e GRZYBICKI, 1996) e que a iNOS quando expressa, produz altos níveis de NO constantemente (BROWN, 2007). Somando-se isso ao conhecimento de que microglia quando estimulada com LPS libera TNF ao longo de 1-8h (NAKUMURA *et al.*, 1999; SHENG *et al.* 1995) e que a ativação autócrina da microglia via TNF pode levar a ativação crônica da mesma, induzindo assim o aumento de mediadores inflamatórios, como o NO (KUNO *et al.*, 2005) via transcrição de genes da iNOS (MURPHY e GRZYBICKI, 1996), hipotetizamos que o TNF pode ter sido produzido precocemente na cultura e isso pode ter ativado a iNOS, desencadeando assim níveis aumentados de nitrito observado nas 72h de experimento.

Essa produção de NO, juntamente com a proliferação parasitária, pode ter sido responsável pela redução da viabilidade celular encontrada no estudo. Lee *et al.* (2001), demonstram que células microgliais de camundongos BV-2 e culturas primárias de microglia de ratos, após estímulo com LPS e IFN- γ sofreram morte celular via apoptose através da liberação de NO. Acrescida a essa via, Moss e Bates (2001) trabalhando com microglia de murinos e mesma fonte de estímulo (LPS e IFN- γ), demonstraram que a liberação de altos níveis de NO resulta em dano à membrana plasmática, como avaliado pela liberação de LDH no sobrenadante e o aumento da porcentagem de células permeáveis ao Azul de Trypan. Esses mesmos autores explicam que acompanhado ao dano na membrana plasmática, houve a diminuição da glutathione intracelular, que é uma molécula antioxidante responsável por proteger proteínas, lipídeos e DNA contra ataques de ERO (FERNANDEZ-CHECA *et al.*, 1997). Sua diminuição, por conseguinte, torna as enzimas responsáveis pela fosforilação oxidativa mais susceptíveis ao dano por NO, como observado pela inibição da atividade dos complexos mitocondriais I e IV, comprometendo assim a cadeia respiratória mitocondrial (BOLANOS *et al.*, 1995) e a produção de ATP (BROOKES *et al.*, 1999). Em posse desses conhecimentos, acreditamos que o aumento do dano oxidativo através do NO, leva a progressivo declínio da viabilidade celular, como resultado de um fornecimento insuficiente de energia e/ou aumento da suscetibilidade à apoptose.

Além dos níveis de NO, outro fator investigado foi a produção de citocinas IFN- γ , TNF e IL-10 para tentar entender como estas poderiam participar da modulação da resposta da microglia ao parasito. Foi verificado não haver aumento significativo na produção de citocinas inflamatória (TNF e IFN- γ) durante a infecção, o que poderia justificar a falta de controle da proliferação parasitária em 72h de experimento. Lee e Benveniste (1999) em trabalho de revisão apontaram que citocinas como TNF e IL-1 estão envolvidas, principalmente, com o início do processo inflamatório, por suas habilidades de induzir moléculas de adesão e quimiocinas necessárias para atrair os leucócitos. Assim, embora a produção de IL-1 não tenha sido avaliada neste estudo, a ausência de aumento significativo na liberação de TNF em culturas de microglia infectadas, pode representar um mecanismo de resposta que evite o envolvimento de células inflamatórias da resposta imune sistêmica, o que em condições *in vivo*, levaria a efeitos deletérios no tecido nervoso durante o curso desta infecção.

Um indício de que este mecanismo é resultado da interação parasito e microglia foi observado quando as culturas foram tratadas com LPS e responderam com elevada liberação de TNF. Esse achado se apoia no fato de diversos estudos anteriores terem mostrado que o LPS (em diversas concentrações) é capaz de induzir a liberação de TNF em microglia (AJMONE-CAT *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2002; NAKUMURA *et al.*, 1999;

ROCK *et al.*, 2004).

No contexto da infecção, o mesmo pode ser pensado/extrapolado para o IFN- γ . Pinheiro *et al.* (2006b; 2010) sugeriram que a não detecção de IFN- γ em culturas de astrócitos e astrócitos/microglia poderia ser resultado da regulação negativa mediada por IL-10 visando reduzir o efeito deletério daquela citocina. Efeito esse foi comprovado por diversos estudos, entre eles o de Badie *et al.*, (2000), onde o IFN- γ induziu apoptose de microglia de roedores, através da regulação positiva de Fas e FasL. Já Rozenfeld *et al.*, (2003) verificaram que a produção de NO por células microgliais ativadas por IFN- γ foi inibida por mediadores imunorregulatórios solúveis liberados por astrócitos infectados com *T. gondii*, e que isto favorecia a viabilidade neuronal. Por sua vez, Scheidegger *et al.* (2005) trabalhando com culturas organotípicas de tecido cortical de cérebro de rato infectado com *T. gondii*, verificaram que o tratamento com IFN- γ teve um efeito negativo sobre a integridade estrutural e a viabilidade do tecido neuronal.

Ao passo que não houve produção das citocinas IFN- γ e TNF, foi verificada a ocorrência de aumento na produção de IL-10, o que poderia está associado à regulação negativa da produção dessas citocinas inflamatórias e que permitiria a proliferação do parasito. Nossos achados estão em consonância com o trabalho de Deckert-Schluter *et al.*, (1997), que associaram a resposta inflamatória da microglia à liberação dessa citocina e ainda, com o trabalho de Wilson *et al.*, (2005), onde esta citocina modulou negativamente a síntese de citocinas pro inflamatórias como IFN- γ , TNF, IL-12 e IL-6. Em 1997, Deckert-Schlüter *et al.*, realizaram experimentos de neutralização de IL-10 *in vivo*, em cérebros de camundongos infectados com *T. gondii*, revelando que a presença dessa citocina facilitava a persistência do parasito no cérebro por supressão da resposta imune do SNC, dado corroborado por Wilson *et al.* (2005) em estudos com células mononucleares de cérebro de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*.

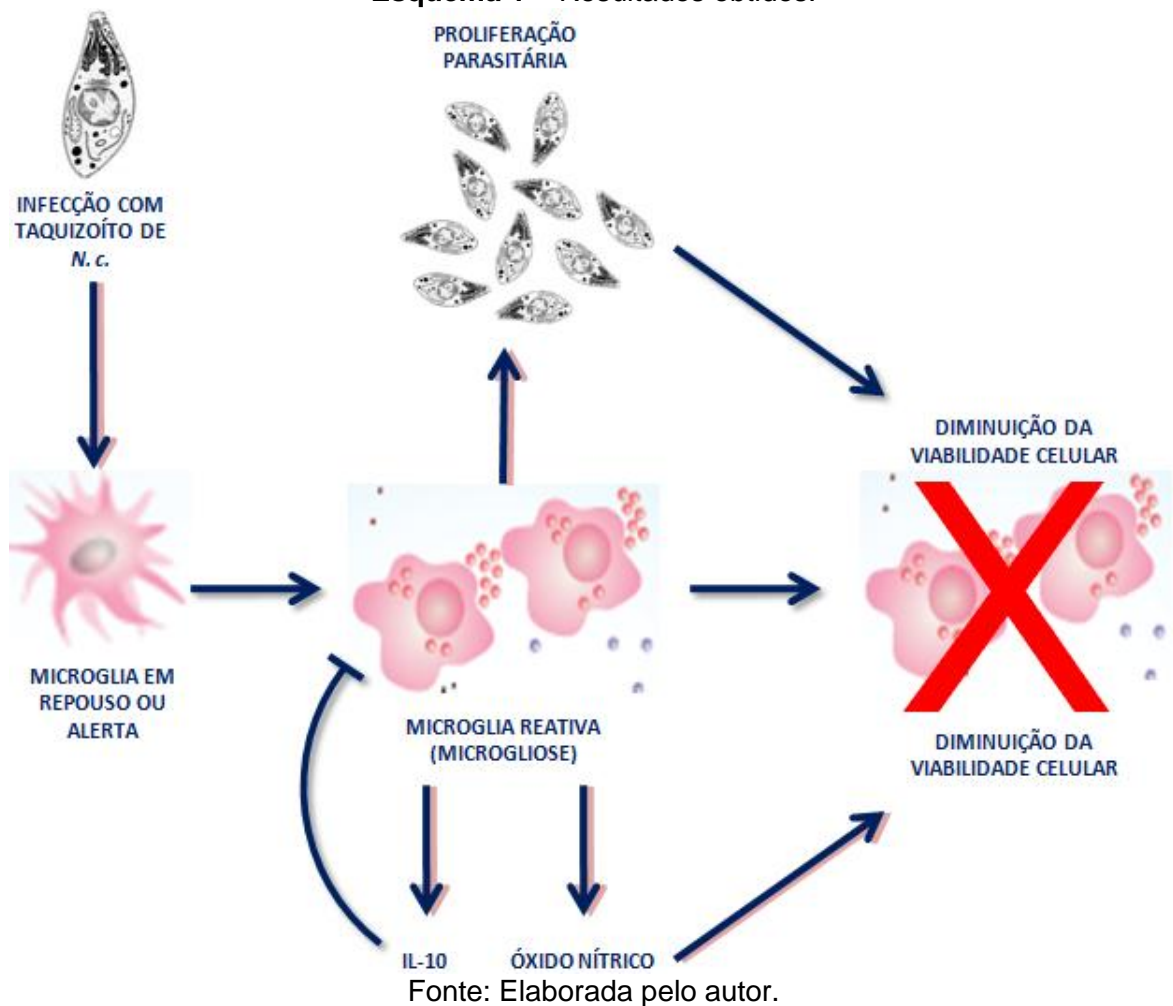
Por outro lado, o perfil de resposta regulatório com liberação de IL-10 pela microglia frente ao estímulo de LPS, pode ser explicado através de alguns trabalhos que utilizaram células microgliais e monócitos. Eles demonstraram que sob estímulo agudo de LPS a microglia libera inicialmente TNF, IL-1 β , IL-6 e NO ao longo de 1-8h e uma produção atrasada de IL-10 ao longo de 6-20h (MALEFYT *et al.*, 1991; NAKUMURA *et al.*, 1999; SHENG *et al.* 1995). Foi também observado que os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF decrescem ao longo de 48h (MALEFYT *et al.*, 1991; NAKUMURA *et al.*, 1999) ao tempo que os níveis de NO e IL-10 aumentam (MALEFYT *et al.*, 1991; NAKUMURA *et al.*, 1999; SHENG *et al.* 1995).

Além disso, Malefyt *et al.* (1991), demonstraram que quando as culturas de monócitos foram inibidas por anticorpos monoclonais anti-IL-10, as citocinas IL-1 α/β , IL-6 e TNF foram liberadas em grandes quantidades. Em complementação Sheng *et al.*

(1995), mostrarem que culturas microgliais tratadas com TNF resultaram em uma liberação dose dependente de IL-10 e que o tratamento de culturas com IL-10 marcadamente inibiram a liberação aguda de TNF. Reforçando o importante efeito regulatório da IL-10 em relação à resposta imunológica e inflamatória.

Em conclusão, o estudo analisou individualmente a resposta da microglia na infecção por *N. caninum*, dosando para isso citocinas/mediadores derivados da mesma. Resumidamente, a microglia frente à infecção mudou sua morfologia para um fenótipo ameboide, que representa um estado ativado. Porém na ausência de níveis significativos de citocinas que controlassem a proliferação de taquizoítos, como TNF e IFN- γ , (JESUS *et al.*, 2013; YAMANE *et al.*, 2000), provavelmente devido a modulação negativa da IL-10 (Boche *et al.*, 2003), ocorreu perda de viabilidade microglial por estresse oxidativo e por proliferação e invasão celular parasitária facilitadas (esquema 1). Esses dados apontam para estudos futuros a fim de melhor entender os mecanismos de destruição e controle do taquizoíto pelas células macrofágicas residente do SNC, podendo com isso contribuir para um entendimento local, nas interações com neurônios e astrócitos, e geral, nas interações com as moléculas e células atuantes no sistema imune durante a infecção.

Esquema 1 – Resultados obtidos.



Referências

1. AJMONE-CAT, M. A.; NICOLINI, A.; MINGHETTI, L. Prolonged exposure of microglia to lipopolysaccharide modifies the intracellular signaling pathways and selectively promotes prostaglandin E2 synthesis. *Journal of Neurochemistry*, v. 87, p. 1193-203, 2003.
2. BADIE, B.; SCHATNER, J.; VORPAHL, J.; PRESTON, K. Interferon-g induces apoptosis and augments the expression of Fas and Fas ligand by microglia *in vitro*. *Experimental Neurology*, v. 162, p. 290-6, 2000.
3. BOCHE, D.; CUNNINGHAM, C.; GAULDIE, J.; PERRY, V. H. Transforming growth factor-beta 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury *in vivo*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 23, p. 1174-82, 2003.
4. BOLAÑOS, J. P.; HEALES, S. J. R.; LAND, J. M.; CLARK, J. B. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary cultures. *Journal of Neurochemistry*, v. 64, p. 1965-72, 1995.
5. BROOKES, P. S.; BOLAÑOS, J. P.; HEALES, S. J. R. The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct. *FEBS Letters*, v. 446, p. 261-3, 1999.
6. BROWN, G. C. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, n. 5, p. 1119-21, 2007.
7. CHAO, C. C.; ANDERSON, W. R.; HU, S.; GEKKER, G.; MARTELLA, A.; PETERSON, P. K. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 67, p. 178-83, 1993.
8. CHAO, C. C.; GEKKER, G.; HU, S.; PETERSON, P.K. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *The Journal of Immunology*, v. 152, p. 1246-52, 1994.
9. DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L.; GAN, W.-B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nature Neuroscience*, v. 8, p. 752-8, 2005.
10. DECKERT-SCHLUTER, M.; BUCK, C.; WEINER, D.; KAEFER, N.; RANG, A.; HOF, H.; WIESTLER, O. D.; SCHLUTER, D. Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma encephalitis*. *Journal of Neuroimmunology*, v. 76, p. 167-76, 1997.
11. DIAB, M. R.; EL-BAHY, M. M. *Toxoplasma gondii*: virulence of tachyzoites in serum free media at different temperatures. *Experimental Parasitology*, v. 118, p. 75-9, 2008.
12. DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKÅS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.;

- MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S.,. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 929-46, 2002.
13. DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals - the last five years. *Veterinary Parasitology*, v. 180, p. 90-108, 2011.
 14. DUBEY, J.P., BUXTON, D., WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, p. 267-89, 2006.
 15. FERNANDEZ-CHECA, J. C., KAPLOWITZ, N.; GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MIRANDA, M.; MARI, M.; ARDITE, E.; MORALES, A. GSH transport in mitochondria: defence against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *American Journal of Physiology*, v. 273, p. G7-17, 1997.
 16. GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. C.; MECH, L. D.; NELSON, M. E.: Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology*, v. 90, p. 1361-5, 2004.
 17. HANISCH, U.-K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, v. 10, n. 11, p. 1387-94, 2007.
 18. HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 133, p. 261-78, 2006.
 19. JESUS, E. E. V. Imunopatogênese da infecção por *Neospora caninum* em células do Sistema Nervoso Central: o papel imunomodulatório das células da glia na proteção neuronal. 2011. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2011.
 20. JESUS, E. E.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, A. B.; FREIRE, S. M.; TARDY, M. B.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, S. L.; COSTA, M. F. Effects of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. *Experimental Parasitology*, v. 133, n. 3, p. 269-74, 2013.
 21. KUNO, R.; WANG, J.; KAWANOKUCHI, J.; TAKEUCHI, H.; MIZUNO, T.; SUZUMURA, A. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- α . *Journal of Neuroimmunology*, v. 162, p. 89-96, 2005.
 22. LEE, P.; LEE, J.; KIM, S.; LEE, M.-S.; YAGITA, H.; KIM, S. Y.; KIM, HOCHEOL, H.; SUK, K. NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial. *Brain Research*, v. 892, p. 380-5, 2001.
 23. LEE, S. J.; BENVENISTE, E. N. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, v. 98, p. 77-88, 1999.

24. LI, L.; LU, J.; TAY, S. S. W.; MOOCHHALA, S. M.; HE, B. P. The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia *in vitro*. *Brain Research*, v. 1159, p. 8-17, 2007.
25. LIMA, F. R. S.; GERVAIS, C.; COLIN, C.; IZEMBART, M.; NETO, M. V.; MALLAT, M. Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 6, p. 2028-38, 2001.
26. LIU, B.; GAO, H. M.; WANG, J. Y.; JEOHN, G. H.; COOPER, C. L.; HONG, J. S. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 962, p. 318-31, 2002.
27. LONGO-SORBELLO, G. S. A.; SAY, G.; BANERJEE, D.; BERTINO, J. R. Cytotoxicity and Cell Growth Assay. In: CELLIS, E. J. (Org) *Cell biology: a laboratory handbook*. San Diego: Elsevier, p. 315-16, 2006.
28. LU, X.; MA, L.; RUAN, L.; KONG, Y.; MOU, H.; ZHANG, Z.; WANG, Z.; WANG, J. M.; LE, Y. Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, v. 7, n. 46, p. 1-14, 2010.
29. LUDER, C. G. K.; GIRALDO-VELASQUEZ, M.; SENDTNER, M.; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Experimental Parasitology*, v. 93, p. 23-32, 1999.
30. MALEFYT, R. W.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; VRIES, J. E. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 174, p. 1209-20, 1991.
31. MARIANI, M. M.; KIELIAN, T. Microglia in infectious diseases of the central nervous system. *Journal of NeuroImmune Pharmacology*, v. 4, n. 4, p. 448-61, 2009.
32. MOSS, D. W.; BATES, T. E. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-g causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *European Journal of Neuroscience*, v. 13, p. 529-38, 2001.
33. MURPHY, S.; GRZYBICKI, D. Glial NO: normal and pathological roles. *Neuroscientist*, v. 2, p. 91-100, 1996.
34. NAKAMURA, Y.; SI, Q. S.; KATAOKA, K. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neuroscience Research*, v. 35, p. 95-100, 1999.
35. PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; ALMEIDA, M. A. O.; TARDY, M. ; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. D. Evaluation of IL-6, IL-10 and TNF- α in mixed glial cultures infected by *N. caninum*. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 442-7, 2010.
36. PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; ALMEIDA, M. A.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. D. Astroglial cells in primary culture: a valid model to study

- Neospora caninum* infection in the CNS. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 15, p. 243-7, 2006a.
37. PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; ALMEIDA, M. A.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. D. *Neospora caninum*: infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. *Experimental Parasitology*, v. 112, p. 193-7, 2006b.
 38. PLATTNER, F.; SOLDATI-FAVRE, D. Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. *Annual Review of Microbiology*, v. 62, p. 471-87, 2008.
 39. REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; SODUPE, I.; ADURIZ, G.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; POZO, I. D.; ORTEGA-MORA, L. M. *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Veterinary Research*, v. 42-41, p. 1-11, 2011.
 40. ROCK, R. B.; GEKKER, G.; HU, S.; SHENG, W. S.; CHEERAN, M.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P. K. Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 942-64, 2004.
 41. ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; FIGUEIREDO, R. T.; BOZZA, M. T.; LIMA, F. R.; PIRES, A. L.; SILVA, P. M.; BONOMO, A.; LANNES-VIEIRA, J.; SOUZA, W.; MOURA-NETO, V. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 4, p. 2047-57, 2003.
 42. SANTOS, A. B. Potencial imunomodulatório das frações de glicoconjugados de *Neospora caninum* em culturas primárias de células gliais de ratos. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2010.
 43. SANTOS, J. M.; LEBRUN, M.; DAHER, W.; SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F. Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. *International Journal for Parasitology*, v. 39, p. 153-62, 2009.
 44. SCHEIDEGGER, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A.; GIANINAZZI, C.; MULLER, N.; LEIB, S. L.; HEMPHILL, A. Differential effects of interferon-g and tumor necrosis factor-a on *Toxoplasma gondii* proliferation in organotypic rat brain slice cultures. *Journal of Parasitology*, v. 91, n. 2, p. 307-5, 2005.
 45. SHENG, W. S.; HU, S.; KRAVITZ, F. H.; PETERSON, P. K.; CHAO, C. C. Tumor necrosis factor alpha upregulates human microglial cell production of interleukin-10 in vitro. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 2, p. 604-8, 1995.
 46. TAMBUYZER, B. R.; PONSARTS, P.; NOUWEN, E. J. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 85, n. 3, p. 352-70, 2009.

47. VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, p. 17-21, 2006.
48. WILSON, E. H.; WILLE-REECE, U.; DZIERSZINSKI, F.; HUNTER, C. A. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *Journal of Neuroimmunology*, v. 165, p. 63-74, 2005.
49. XIN, G.; SU, Y.; GAO, Y.-L.; ZHANG, H.; WANG, G.-F.; LI, K.-S. Lipopolysaccharide enhances asymmetrical production of cytokines and nitric oxide by left and right cerebral cortical microglial cells in BALB/C mice. *Cell Biochemistry And Function*, v. 29, p. 50-4, 2011.
50. YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMIZU, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K.; YOKOMIZO, Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 62, p. 347-51, 2000.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As culturas de células microgliais infectadas com taquizoítos de *Neospora caninum* não controlam a sua proliferação, levando à perda de viabilidade celular. Esta limitação pode estar associada à falta de intercomunicações com as outras células do SNC e sistema imune as quais poderiam corroborar o controle mais eficiente da proliferação parasitária e do dano tecidual.

A perda de viabilidade celular através da infecção e do LPS está associada, em parte, com o aumento nos níveis de nitrito, talvez pela própria produção contínua de óxido nítrico, sabidamente citotóxico para as células.

A resposta resultante da interação de células microgliais com *Neospora caninum* durante a infecção é capaz de liberar a citocina anti-inflamatória IL-10, que pode ter regulado negativamente a liberação das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF, favorecendo a persistência e proliferação descontrolada dos taquizoítos. Já o tratamento com LPS, apenas difere pelo também aumento do TNF, indicando ser um estimulador mais eficiente para a resposta microglial.

6. REFERÊNCIAS

1. ALOISI, F. Immune function of microglia. *Glia*, v. 36, p. 165-79, 2001.
2. ALOISI, F.; PENNA, G.; POLAZZI, E.; MINGHETTI, L.; ADORINI, L. CD40-CD154 Interaction and IFN- γ are required for il-12 but not prostaglandin e2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 3, p. 1384-91, 1999.
3. BENVENISTE, E. N. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *American Journal of Physiology*, v. 263, p. C1-C16, 1992.
4. BIBER, K.; ZUURMAN, M. W.; DIJKSTRA, I. M.; BODDKE, H. Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 2, p. 63-8, 2001.
5. BJERKAS I.; MOHN S. F.; PRESTHUS J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 70, p. 271-4, 1984.
6. BRACCI-LAUDIERO, L. Nerve glue comes unstuck. Disponível em: www.neurophilosophy.wordpress.com/2007/03/07/nerve-glue-comes-unstuck/. Acesso em: 25/02/13.
7. BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, v. 214, p. 149-60, 2008.
8. BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron*, v. 13, n. 2, p. 301-13, 1994.
9. BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *TRENDS in Parasitology*, v. 18, n. 12, p. 546-52, 2002.
10. DUBEY, J. P. Recent advances in Neospora and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 84, p. 349-67, 1999.
11. DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA A. A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, p. 1269-85, 1988.
12. DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKÅS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.;

- KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 8, p. 929-46, 2002.
13. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 67, p. 1-5, 1996.
 14. DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals - the last five years. *Veterinary Parasitology*, v. 180, p. 90-108, 2011.
 15. DUBEY, J.P., BUXTON, D., WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, p. 267-89, 2006.
 16. DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G.. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-50, 2003.
 17. GIRALDI, J. H.; BRACARENSE, A. P. E. R. L.; VIDOTTO, O. Neosporose canina - revisão. *Clínica Veterinária*, v. 6, n. 34, p. 50-4, 2001.
 18. GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. C.; MECH, L. D.; NELSON, M. E.: Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology*, v. 90, p. 1361-5, 2004.
 19. HANISCH, U.-K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, v. 40, p. 140-55, 2002.
 20. HE, S.; SUN, Y. E. Glial cells more than support cells? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 661-5, 2007.
 21. HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 133, p. 261-78, 2006.
 22. JESUS, E. E. V. Imunopatogênese da infecção por *Neospora caninum* em células do Sistema Nervoso Central: o papel imunomodulatório das células da glia na proteção neuronal. 2011. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2011.
 23. JESUS, E. E.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, A. B.; FREIRE, S. M.; TARDY, M. B.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, S. L.; COSTA, M. F. Effects of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. *Experimental Parasitology*, v. 133, n. 3, p. 269-74, 2013.

24. KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; FONSEKA, S.; KASPER, L. H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Experimental Parasitology*, v. 85, p. 24-34, 1997.
25. LEE, C. K.; WEINDRUCH, R.; PROLLA, T. A. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature Genetics*, v. 25, p. 294-7, 2000.
26. LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, p. S232-40, 2006.
27. MARKS, J.; LUNDEN, A.; HARKINS, D.; INNES, E. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4⁺ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunology*, v. 20, p. 1-7, 1998.
28. MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 28, p. 1473-78, 1998.
29. MURPHY, S.; SIMMONS, M. L.; AGULLO, L.; GARCIA, A.; FEINSTEIN, D. L.; GALEA, E.; REIS, D. J.; MINC-GOLOMB, D.; SCHWARTZ, J. P. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends in Neurosciences*, v. 16, p. 323-8, 1993.
30. NDUBAKU, U.; BELLARD, M. E. Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochemica*, v. 110, n. 3, p. 182-95, 2008.
31. OGAWA, Y.; DURU, E. A.; AMEREDES, B. T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Current Molecular Medicine*, v. 8, n. 5, p. 437-45, 2008.
32. PARISH, S. M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T. E.; WEIDNER, J. P.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D. P.; LEATHERS, C. W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 191, p. 1599-600, 1987.
33. PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; ALMEIDA, M. A. O.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. D. Evaluation of IL-6, IL-10 and TNF- α in mixed glial cultures infected by *N. caninum*. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 442-7, 2010.
34. PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; ALMEIDA, M. A.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. D. *Neospora caninum*: infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. *Experimental Parasitology*, v. 112, p. 193-7, 2006.

35. ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in Neurosciences*, v. 23, p. 618-25, 2000.
36. ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; FIGUEIREDO, R. T.; BOZZA, M. T.; LIMA, F. R.; PIRES, A. L.; SILVA, P. M.; BONOMO, A.; LANNES-VIEIRA, J.; SOUZA, W.; MOURA-NETO, V. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 4, p. 2047-57, 2003.
37. SAWADA, M.; SUZUMURA, A.; HOSOYA, H.; MARUNOUCHI, T.; NAGATSU, T. IL-10 inhibits both production of cytokine and expression of cytokine receptors in microglia. *Journal of Neurochemistry*, v. 72, p. 1466-71, 1999.
38. SCHWARTZ, M. Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 23, n. 4, p. 385-94, 2003.
39. TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. The role of CD4⁺ or CD8⁺ T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Veterinary Parasitology*, v. 90, p. 183-91, 2000.
40. TEIXEIRA, S. A.; VARRIANO, A. A.; DIAS, A. A.; PORTO, R. M.; MUSCARA, M. N. Nitric oxide synthase activity and endogenous inhibitors in rats recovered from allergic encephalomyelitis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 25-7, 2005.
41. YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMIZU, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K.; YOKOMIZO, Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 62, p. 347-51, 2000.