

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**POTENCIAL MODULATÓRIO DO MEL DE JATAÍ (*Tetragonista
angustula*) EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS DE RATOS
INFECTADAS *in vitro* COM *Neospora caninum*.**

JAMILLE OLIVEIRA CAMPOS GONÇALVES

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2011

POTENCIAL MODULATÓRIO DO MEL DE JATAÍ (*Tetragonista angustula*) EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS DE RATOS INFECTADAS *in vitro* COM *Neospora caninum*.

JAMILLE OLIVEIRA CAMPOS GONÇALVES

Médica Veterinária

Universidade Estadual de Santa Cruz, 2004

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof^o Pós Dr^o Alexandre Moraes Pinheiro

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Larissa Pires Barbosa

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
JAMILLE OLIVEIRA CAMPOS GONÇALVES**

Prof. Pós Drº Alexandre Moraes Pinheiro
(Orientador)

Prof. Drº Jair de Araújo Marques
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Profª Drª Cátia Suse O. Ribeiro
Universidade Federal da Bahia

"O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar."

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico a Deusa, a mãe Onipresente, Onipotente e Onisciente que tudo gera, na qual tomo por imagem a Nossa Senhora das Graças, cuja força, determinação e segurança me fazem sempre ser mais.

Dedico com todo Amor a família na qual nasci que é meu alicerce e fortaleza. Aos meus avós e antepassados (*in memoriam*), meu pai Pedro Campos, minha mãe Maria do Carmo Oliveira e meus irmãos: Daniella, Danusa e Pedrinho.

Dedico também na mesma intensidade a família que constituí com meu marido Geógenes, companheiro de todas as horas, responsável pelo melhor presente da minha vida, meu tesouro, minha filha **Maria Luiza!**

AGRADECIMENTOS

A Alexandre, meu querido orientador e amigo, por toda confiança, exemplo, estímulo, liberdade e apoio que sempre me deu.

Ao meu esposo Geógenes pelo companheirismo, amor e atenção.

A minha co-orientadora Larissa, pelo carinho e atenção.

A Prof^a Meibi pelo carinho em todas as vezes que precisei de seu apoio nas análises estatísticas.

Ao Prof^o Jair, pelos valiosos ensinamentos sobre o bem estar animal.

Ao Prof^o Alfredo, por gentilmente nos ceder o mel utilizado no experimento.

A Prof^a Maria de Fátima, por nos ceder seu laboratório e parte do material utilizado para realização do experimento.

As Prof^a Sílvia e Cátia Suse, pelo carinho com nos acolheu, eu e a minha família, durante todo o experimento.

Aos meus amigos Fagner e Ludmilla, pela amizade sincera, apoio e estímulo constantes.

Aos colegas do mestrado, em especial Lilian e Samira, pela amizade e parceria.

As estagiárias Lígia e Cintia, pela companhia e ajuda.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

E a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente pela realização desta obra, um sincero Muito Obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do parasito <i>Neospora caninum</i> (adaptado de DUBEY <i>et al.</i> , 2003).....	9
Figura 2 - Representação esquemática das funções fisiológicas atribuídas aos astrócitos e correlações com outros tipos celulares (Adaptado de Tardy 1991; Van Wangoner & Benveniste, 1999).....	18
Figura 3- Principais peptídios e proteínas expressos por astrócitos reativos e seus papeis. (Adaptado de Noremborg 1994; Tardy 2001).....	21
Figura 4- Interações das células gliais com o sistema imunológico (Adaptado de Tardy <i>et al.</i> ,2001; Bolin <i>et al.</i> ,2005).....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA – Teste imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IFI - Imunofluorescência indireta

IFN- γ - Interferon gama

IL-6 - Interleucina-6

IL-12 - Interleucina-12

IL-10 - Interleucina-10

IL-1 - Interleucina-1

LDH - Lactato desidrogenase

LPS - Lipopolissacarídeos

MTT - [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]

NAT - teste de aglutinação

NC - *Neospora caninum*

NK - Células natural killers

NO - Óxido nítrico

PCR - Reação de polimerase em cadeia

TGF- β – Fator de crescimento transformador- β

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

SNC – Sistema nervoso central

POTENCIAL MODULATÓRIO DO MEL DE JATAÍ (*Tetragonista angustula*) EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS DE RATOS INFECTADAS *in vitro* COM *Neospora caninum*.

Autor: Jamille Oliveira Campos Gonçalves

Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro

RESUMO: *Neospora caninum* é um protozoário causador da neosporose. Considerado uma das principais causas de abortos, gera grande impacto econômico em criações bovinas e provoca alterações neuromusculares em cães. Os primeiros relatos na literatura, sobre a resposta imunológica na infecção por *N. caninum* em células gliais foram descritos por Pinheiro, demonstrando ser um modelo de estudo para o protozoário. O mel é popularmente conhecido por controlar infecções e reações inflamatórias. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar as alterações celulares em culturas de astrócitos de ratos infectadas com *N. caninum*, submetidos *in vitro* ao tratamento com o mel da abelha *T. angustula*. Culturas primárias de astrócitos de ratos neonatos foram tratadas com 1% de mel no oitavo dia após o cultivo e infectados com taquizoítos de *N. caninum*, da cepa NC-Bahia, no 15^o dia de cultura. A reorganização do gliofilamento de astrócitos, o metabolismo celular, o número de parasitos e a permeabilidade celular foram investigadas 72h após a infecção com *N. caninum*. Hipertrofia celular, aumento na permeabilidade celular, aumento no metabolismo mitocondrial e elevação dos níveis de óxido nítrico foram observados em culturas tratadas com 1% de mel. Nas culturas tratadas com 1% de mel e infectadas com *N. caninum*, foram observados aumento na expressão da GFAP e estabilização no número de taquizoítos. Estes resultados demonstram que o mel conferiu proteção contra a infecção.

Palavras-chave: astrócitos, neosporose, mel, taquizoítos

**MODULATORY POTENTIAL OF HONEY JATAÍ (*Tetragonia angustula*) IN
ASTROCYTE CULTURES OF RATS INFECTED *in vitro*
WITH *Neospora caninum*.**

Author: Jamille Oliveira Campos Gonçalves

Advisor: Alexandre Moraes Pinheiro

Abstract: *Neospora caninum* is a protozoan that causes neosporosis. Considered a major cause of abortions, generate large economic impact in livestock cattle and causes neuromuscular disorders in dogs. The first reports in the literature on the immune response in infection by *N. caninum* in glial cells have been described by Pinheiro, proving to be a model to study the parasite. Honey is popularly known to control infections and inflammatory reactions. Therefore, this project aims to evaluate the cellular changes in cultured astrocytes of rats infected with *N. caninum*, undergo *in vitro* treatment with the honey bee *T. angustula*. Primary cultures of neonatal rat astrocytes were treated with 1% honey on the eighth day after culture and infected with tachyzoites of *N. caninum*, strain NC-Bahia, on the 15th day of culture. The reorganization of glicofilamento astrocytes, cell metabolism, the number of parasites and cell permeability were investigated 72 h after infection with *N. caninum*. Cellular hypertrophy, increased cell permeability, increase in mitochondrial metabolism and elevated levels of NO were observed in cultures treated with 1% honey. In cultures treated with 1% honey and infected with *N. caninum* were observed increased expression of GFAP and stabilization in the number of tachyzoites. These results showed that honey gave protection against infection.

Keywords: astrocytes, neosporosis, honey, tachyzoites

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
SUMMARIO.....	XII
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1 História da <i>Neosporose</i>	4
1.2. Impactos econômicos.....	6
1.3. Biologia da neosporose	8
1.3.1. Transmissão	9
1.4. Imunologia da neosporose.....	12
2. Sistema nervoso central.....	16
2.1. Astrócitos	17
2.2. Interação neurônio-glia	19
2.3. Células gliais e citocinas	20
3. Mel de abelha.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
4. ARTIGO CIENTÍFICO	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário reconhecido há cerca de duas décadas, que infecta diversas espécies animais domésticas e silvestres, e possui cães, dingos (*Canis lupus dingo*) e coiotes (*Canis latrans*) como hospedeiros definitivos (McCallister *et al.*, 1998a; Gondim *et al.*, 2004a; King *et al.*, 2010). Esse parasito foi primeiramente identificado em cães, na Noruega, relacionado a um quadro de paralisia com a presença de cistos no cérebro e tecido muscular (Bjerkas *et al.*, 1984).

A neosporose, enfermidade causada por *N. caninum*, apresenta uma distribuição mundial, e os prejuízos causados por esta parasitose são relevantes para a indústria agropecuária. Isso ocorre por se tratar de uma doença que acomete rebanhos leiteiros ou de corte, nos quais causa abortamentos (Dubey e Lindsay, 1996; Dubey *et al.*, 2006; Gondim, 2006). No Brasil, foi detectado o primeiro relato de neosporose bovina em 1999 (Gondim *et al.*, 1999a).

Este protozoário apresenta três formas infectantes: os taquizoítos, formas de proliferação rápida; os cistos teciduais, os quais se encontram cheios de bradizoítos, forma de multiplicação lenta e, os oocistos (Dubey *et al.*, 1988a; McCallister, 1998a).

A agressão ao sistema nervoso do hospedeiro é uma das principais manifestações clínicas da neosporose em cães e bovinos recém nascidos. Pinheiro *et al.*, (2006a), descreveu um modelo *in vitro* de infecção de células gliais pelo *N. caninum*, para estudar aspectos de sua patogenicidade e investigar a capacidade de resposta imune do sistema nervoso central (SNC) a esta infecção dentre outras funções, as células da glia estão diretamente relacionadas com a formação e armazenamento de glicogênio (Dienel e Cruz, 2006). A cultura destas células constitui um modelo de estudo de fenômenos fisiopatológico do SNC,

permitindo o entendimento destas na presença de um parasito (Costa *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.* 2006b).

Os astrócitos constituem mais da metade de toda a população glial (60-70% do total de células gliais) e apresenta-se em forma de estrela, daí o seu nome (Tardy *et al.*, 1991; Kandel, 2000; Pekny e Nilsson, 2005). Essas células são responsáveis pelo armazenamento do glicogênio. Em situações de hipoglicemia os astrócitos liberam o glicogênio existente na célula, garantindo o fornecimento de energia para os neurônios (Dienel e Cruz, 2006). Desta forma, contribuem ativamente para o suporte energético e para a resposta imune do SNC contra agentes químicos, infecciosos ou traumatismos (Letournel-Boulland *et al.*, 1994; Barres & Bardes, 2000, Pekny e Nilsson, 2005).

Considerados como importantes células de defesa, os astrócitos são conhecidos como potentes produtores de citocinas pró-inflamatórias (Van Wagoner & Benveniste, 1999; Lai e Todd, 2006). Além disso, são capazes de suprimir a ativação, proliferação e função efetora de células T invasoras, podendo também atuar como células apresentadoras de antígenos (Gimsa *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2006).

Estas células são as primeiras a responder a um ataque ou lesão no SNC (Noremborg, 1994). Por isso são conhecidas por reagir tanto a fatores inflamatórios, como imunes, desencadeando proliferação, liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão e apresentação de antígenos (Iadecola, 2004; Koehler *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006).

Na medicina antiga, existem relatos de mais de 500 remédios utilizados, onde o uso do mel está presente. Nestes medicamentos, o mel é um dos principais componentes. Utilizado pelo homem neste período como primeira fonte de energia, o mel simbolizava a fartura (Couto & Couto, 2002).

Fonte natural de saúde, o mel na atualidade é bastante utilizado nas indústrias farmacêuticas, devido às suas qualidades terapêuticas (Silva *et al.*, 2004). Tem sido mencionado por suas variedades de propósitos medicinais e nutricionais (Molan, 2001) tais como: atividade antimicrobiana (Snow e Manley-Harris, 2004; Bonany *et al.*, 2010) protetor de mucosa contra doenças gastrointestinais (Prakash *et al.*, 2008), propriedades antioxidantes (Al-Mamary *et*

al., 2002; Aljadi e Kamaruddin, 2004) e propriedades prebióticas (Roberfroid, 2000; Shan, 2001). Vários estudos têm utilizado o mel como modulador da resposta imune. Alguns autores consideram que o mel tem propriedades antiinflamatórias (Ansorge *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2007). Entretanto, outros autores descrevem o mel como um agente estimulante da resposta inflamatória, agindo como mediador de citocinas (Al waili, 2003ab; Kohno *et al.*, 2004; Majtán *et al.*, 2006; Tonks *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2009).

O mel da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) é utilizado em terapias populares, principalmente nas zonas rurais e entre indígenas, por possuir manejo fácil e mão de obra familiar (Lopes *et al.*, 2005). Apresenta efeitos imunológicos, anti-inflamatórios, analgésicos, sedativos, expectorantes, hipossensibilizadores e antibacterianos (Breyer, 1983; Bobany *et al.*, 2010).

Não existem dados na literatura que relatem a ação do mel sobre células infectadas com *N. caninum*. Diante disso, este estudo pretende avaliar a ação modulatória do mel de Jataí, sobre astrócitos de ratos, infectados *in vitro* com *N. caninum*.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1- Histórico e epidemiologia da neosporose

Em 1984, Bjerkas, Mohn e Presthus relataram a presença de um parasito diferente de *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso central e musculatura esquelética de cães da raça boxer que apresentavam encefalomielite e miosite severas. À microscopia foram observados numerosos parasitos, severa inflamação e necrose no sistema nervoso central e músculos esqueléticos (Bjerkas, Mohn e Presthus, 1984; Hilali, Lindberg e Waller, 1986). Logo depois, foi observado encefalomielite em bezerros associada a um protozoário semelhante ao *T. gondii*, porém sem detecção de anticorpos anti-parasito (O'toole, Jeffrey, 1987; Parish *et al.*, 1987). Posteriormente, o organismo encontrado nos tecidos caninos foi descrito como *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988a). Em 1989, Thilsted e Dubey, após investigarem um surto de abortamentos em uma propriedade de bovinos leiteiros, identificaram o *Neospora caninum* em amostra de cérebro de 2 dos 9 fetos abortados que foram necropsiados. O primeiro relato de neosporose em animais silvestres ocorreu em 1994, quando *N. caninum* foi identificado em amostras de tecidos de um cervídeo (*Odocoileus hemionus columbianus*) encontrado morto na Califórnia (Woods *et al.*, 1994). Anticorpos anti-*N. caninum* já foram encontrados em outros animais silvestres como alpacas, lhamas, camelos (Hilali *et al.*, 1998; Sadrebazzaz, Haddadzareh e Shayan, 2006), gambás (Yai *et al.*, 2008) e raposas (Buxton *et al.*, 1997).

Dentre os animais domésticos, anticorpos anti-*N. caninum* já foram encontrados no gato doméstico (Ferroglio *et al.*, 2005; Bresciani *et al.*, 2007), suínos (Helmick *et al.*, 2002; Damriyasa *et al.*, 2004), ovinos (Figliuolo *et al.*, 2004b; Vogel *et al.*, 2006; Romanelli *et al.*, 2007), caprinos (Figliuolo *et al.*, 2004a;

Uzêda *et al.*, 2005; Modolo *et al.*, 2008) e eqüinos (Locatelli-Dithrichi, Hoffman e Dithrichi, 2006; Villalobos *et al.*, 2006). Ao estudar os ovinos, Salaberry *et al.*

(2010) observaram uma diferença significativa em rebanhos com problemas de aborto associado à presença de anticorpos anti *N. caninum* em Uberlândia, Minas Gerais. Em caprinos, estudos realizados nos estados de São Paulo, Paraíba e Bahia demonstram uma prevalência de 6,7, 3,3 e 15% respectivamente (Figliuolo 2004b; Faria *et al.*, 2007; Uzêda *et al.*, 2007). Em bubalinos, relatos demonstraram uma soroprevalência de 64%, no Vale do Ribeira (SP), e 39% na Bahia (Fujii *et al.*, 2001; Gondim, Pinheiro e Almeida, 2007). Recentemente Azevedo *et al.* (2010) descreveram o primeiro relato no Brasil de infecção natural por *N. caninum* em suínos no estado da Paraíba.

No Brasil, foi detectado o primeiro relato de neosporose bovina em 1999 e, no mesmo ano, foi realizado o primeiro estudo de soroprevalência nesta espécie, no estado da Bahia, no qual foram identificados anticorpos anti-neospora caninum em 14,1% (63/447) das amostras analisadas (Gondim *et al.*, 1999a; Gondim *et al.*, 1999b). Após esse relato inicial, a neosporose começa a ser alvo de estudos no país, sendo a cepa NC-Bahia isolada, no ano de 2001, proveniente dos tecidos de um cão da raça collie naturalmente infectado (Gondim *et al.*, 2001).

Os dados disponíveis na literatura demonstram a presença do *N. caninum* com diferentes prevalências nos Estados brasileiros. De Souza *et al.* (2002) descreveram a presença de anticorpos anti *N. caninum* em 21,6% dos cães em fazendas no Paraná, sendo que 63% destes cães soropositivos encontravam-se parasitados. Na cidade de São Paulo, 10% de cães da área urbana, com proprietários, e 25% dos cães errantes apresentavam anticorpos anti *N. caninum*. Foi também descrita a prevalência em Minas Gerais de 10,7% em cães de área urbana e 21,7% em animais da zona rural. Rondônia e Paraíba apresentaram valores semelhantes, com 8,3% e 8,4%, respectivamente (Cañon-Franco *et al.*, 2003). Valadas *et al.* (2010) observaram que no Estado do Pará a prevalência de cães soropositivos da área urbana e rural para neosporose eram na ordem de 12,4%, sendo que destes as probabilidades eram maiores em cadelas ($P < 0,02$) da área urbana ($P < 0,01$).

A prevalência em bovinos é de 14,1% na Bahia, 18,2% em Minas Gerais, 14,3% no Paraná e 11,2 % no Rio Grande do Sul (Gondim *et al.*, 1999a; Corbeline

et al., 2002; Melo *et al.*, 2004). Entretanto outro estudo realizado no Paraná por Locatelli-Dittrich, Hoffmann e Dittrich (2004) mostraram que 34,8% dos animais testados foram positivos. Já Benetti *et al.* (2008) observaram uma larga disseminação da neosporose em bovinos de leite (53,5%) em toda região sudoeste Matogrossense. Andreotti *et al.* (2010) associaram a prevalência da neosporose em novilhas de corte (22,13%) às perdas reprodutivas na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul, indicando significativa correlação entre a não-concepção e a presença de anticorpos anti *N. caninum*.

A neosporose é reconhecida como uma das principais doenças causadoras de abortamentos em bovinos em todo mundo (Dubey, 2003). Estudos revelaram que cerca de 16% dos fetos abortados na Escócia eram positivos para *N. caninum*, assim como, na Inglaterra e Reino Unido, a proporção de abortos atribuídos a esse protozoário é de 12,5% (Buxton *et al.*, 1997; Hemphill e Gottstein, 2000). Estudos realizados em uma grande população de bovinos de vários países da Europa demonstraram que a prevalência varia de 16 a 76% para bovinos leiteiros e de 41-61% em bovinos de corte (Bartles *et al.*, 2006).

1.2- Impactos econômicos

A neosporose possui grande importância econômica, principalmente devido às perdas reprodutivas, incluindo retornos ao cio com intervalos regulares ou irregulares, abortos, nascimento de animais fracos e inviáveis com sinais neurológicos ou animais persistentemente infectados (Vogel, Arenhar e Bauermann, 2006; Lima *et al.*, 2007). Em certas explorações o número de abortos é elevado, tornando-se ainda mais preocupante e evidente quando estes ocorrem em um curto período de tempo, sendo esta uma das maiores causas de decréscimo da fertilidade. É de conhecimento geral que, depois dos custos relacionados com a nutrição, a fertilidade é o fator com maior impacto na economia da exploração leiteira (Blowey, 1999; Hobson *et al.*, 2005).

A presença de anticorpo anti *N. caninum* no rebanho pode indicar maior risco de abortamento (Coberllini *et al.*, 2002). Devido às mortes embrionárias e fetais é perdido material genético (Caldow e Gray, 2004), diminuem os lucros da

venda dos vitelos e aumentam os custos com a aquisição de novilhas de substituição (Parkinson e Barret, 2009). A reabsorção do concepto manifesta-se por retorno ao serviço, com conseqüente aumento do tempo até a concepção, ou infertilidade, levando, em longo prazo, a uma diminuição da produção leiteira (Trees *et al.*, 1999). Relativamente às vacas de aptidão cárnea, é sabido que os vitelos, principalmente os machos, são a maior fonte de rendimento e sustentabilidade das explorações (Caldow e Gray, 2004). Além disso, uma vez que as vacas ficam persistentemente infectadas, transmitindo o parasito à descendência, o seu valor comercial diminui bastante (Lee e Kim, 2007).

Cabell (2007) estimou que o custo de um único aborto numa exploração leiteira é em média de 630 libras. Livingstone e Longbottom (2006) referiram também que os prejuízos anuais por infertilidade e aborto nas explorações bovinas perfazem 250 milhões de euros no Reino Unido. Na Europa, as perdas econômicas atribuídas ao aborto, diminuição dos índices de fertilidade e redução da produção leiteira e qualidade do leite referente a um efetivo de 60 vacas adultas e 20 novilhas, levaram a uma perda de 40.000 euros por ano (Livingstone e Longbottom, 2006). Estes valores, apesar de não se encontrarem atualizados nem se referirem à realidade brasileira, permitem ter uma noção real da dimensão dos custos causados por abortos (Fortunato, 2010). É, no entanto, bastante complicado determinar a incidência de perdas de gestação e seu impacto econômico, pois as mortes embrionárias e abortos que ocorrem numa fase inicial da gestação não são facilmente detectáveis, tal como a morte neonatal muitas vezes também não é imediatamente associada a processos que afetaram o feto (Caldow e Gray, 2004).

Lee e Kim, em 2007, analisaram sete explorações leiteiras com vacas holandesas, entre os anos de 2000 e 2006 e puderam concluir que as perdas na fase reprodutiva, em média, aumentaram o intervalo entre partos em 256 dias em vacas que abortaram. As perdas pós-natais por neosporose são difíceis de avaliar, pois, além dos abortos, não existem efeitos óbvios de doença nos animais adultos. Hobson *et al.*, (2005) relatam como outra conseqüência da neosporose a retenção de membranas fetais no pós-parto, causando um processo inflamatório que demanda tratamento quimioterápico e descanso da fêmea. Segundo Dubey,

Schares e Ortega-Mora, (2007) a perda econômica mais importante na neosporose encontra-se associada ao refugo dos animais soropositivos.

O impacto econômico depende não somente das perdas reprodutivas, como também dos custos indiretos como: auxílio profissional, custo de técnicas diagnósticas, necessidade de realizar novas inseminações ou cobrições, aumento do tempo de lactação, possíveis quedas na produção de leite, redução da vida produtiva da vaca (Thurmond e Hietala, 1996; Hobson *et al*, 2002). Essas perdas não estão devidamente quantificadas em todo o mundo. Na Califórnia, estimou-se que esse protozoário causou prejuízos de 35 milhões de dólares por ano aos produtores de leite (Lindsay, 1998). Na Austrália, estimou-se que o *N. caninum* leva a perdas anuais de 85 milhões de dólares na bovinocultura de leite e de 25 milhões de dólares na produção de carne (Walker, 2004).

1.3- Biologia da neosporose

O *N. caninum* pode apresentar-se de três formas: (1) taquizoítos, forma de rápida multiplicação nos tecidos; (2) bradizoítos, forma de lenta multiplicação nos tecidos, interiorizados em cistos teciduais e (3) esporozoítos, encerrados no interior dos oocistos esporulados, estes eliminados, única e exclusivamente, nas fezes dos hospedeiros definitivos (Lindsay *et al.*, 1995; Dubey, 1999).

As formas encontradas nos hospedeiros intermediários são os cistos e os taquizoítos, identificados principalmente no sistema nervoso central (SNC) (Dubey *et al.*, 1988a; McAllister *et al.*, 1999) e encontrados também em músculos esqueléticos de cães e bezerros (Peters *et al.*, 2001). Ambos foram encontrados em outras espécies, a exemplo de caprinos, ovinos e equinos (Dubey *et al.*, 2003; Eleni *et al.*, 2004; Rodrigues, Marchini e Carvalho, 2005)

O ciclo biológico do *N. caninum* foi descrito por McAllister *et al.*, em 1998 (Figura 1). O hospedeiro definitivo elimina oocistos não esporulados nas fezes, contaminando o ambiente (McAllister *et al.*, 1998; Basso *et al.*, 2001). Após 42 a 72 horas, os oocistos que estão no ambiente esporulam, podendo infectar o animal que o ingerir (McAllister *et al.*, 1998). Assim que o hospedeiro intermediário ingere os oocistos esporulados, ocorre liberação dos esporozoítos.

Os esporozoítos que penetram no trato gastrointestinal, atravessam ativamente a mucosa intestinal e promovem a reprodução assexuada, transformando-se em taquizoítos (Lindsay *et al.*, 1999; Dubey, 2006; Gondim, 2006). Quando estes taquizoítos são liberados na corrente sanguínea inicia-se a invasão de outros tecidos causando severas lesões (Buxton *et al.*, 2002; Hemphill *et al.*, 2006). Os taquizoítos, penetram ativamente em diversas células (neurônios, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, células musculares, células dos túbulos renais e hepatócitos) (Dubey, 1988; Dubey e Lindsay, 1996; Innes *et al.*, 2000). Estes se dividem por reprodução assexuada, multiplicando-se no citoplasma em vacúolos parasitóforos, provocando a lise das células dos hospedeiros intermediários (Dubey, 1989; Innes *et al.*, 2000; Buxton *et al.*, 2002).

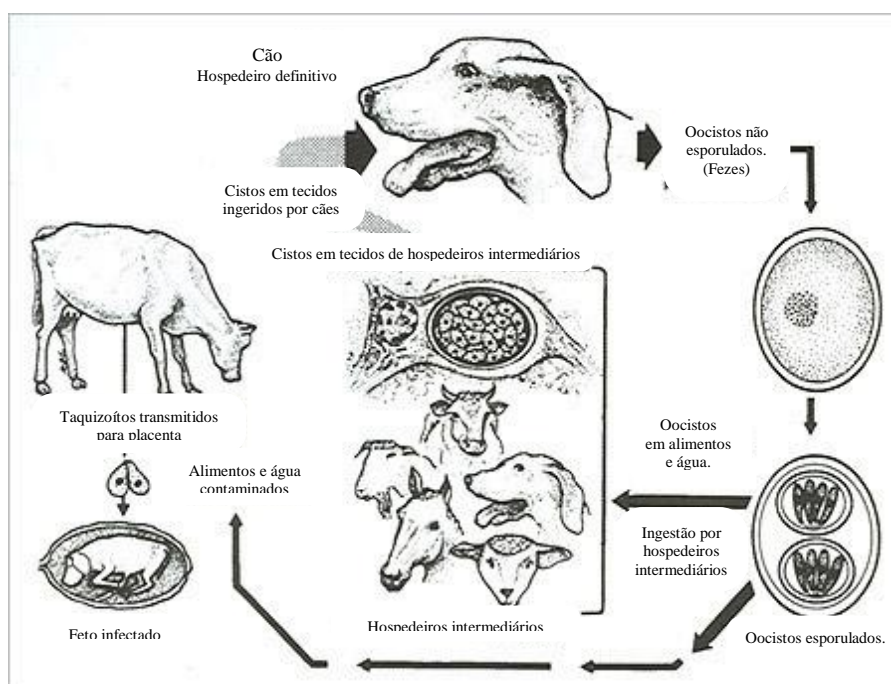


Figura 1. Ciclo de vida do *Neospora caninum* (adaptado de DUBEY *et al.*, 2003)

1.3.1- Transmissão

A neosporose se propaga pelas vias horizontal e vertical, ambas importantes e vitais para a sobrevivência do protozoário (Dubey e Lindsay, 1996). No primeiro caso a contaminação ocorre principalmente pela ingestão de oocistos espalhados pelas fezes de hospedeiros definitivos. Já na disseminação vertical, a infecção

ocorre a partir de uma matriz gestante infectada, onde os taquizoítos atravessam os placentônios, infectando os fetos (Dubey, 2003; Gondim, 2006).

A transmissão horizontal pode ocorrer tanto de cães para outras espécies, assim como de outras espécies, para o cão. Os cães podem contaminar pastagens ou silagem com oocistos que são ingeridos pelos hospedeiros intermediários. Por sua vez, os canídeos podem se infectar ao ingerirem restos de placentas ou abortos de bovinos acometidos de neosporose (McAllister, 1999; Dijkstra *et al.*, 2001). Espécies silvestres também se infectam e apresentam sorologia positiva, sendo os canídeos silvestres recentemente identificados como hospedeiros definitivos (Gondim *et al.*, 2004a; King *et al.*, 2010).

A transmissão vertical, aquela que ocorre de mãe para filho ainda na gestação, foi demonstrada em muitas espécies animais (Buxton *et al.*, 2002), sendo a principal forma de infecção de bovinos (Pare, [Thurmond e Hietala](#), 1996; Schares *et al.*, 1998; Dijkstra *et al.*, 2001; Innes *et al.*, 2005ab). Pouco se sabe, contudo, sobre os fatores que determinam esse tipo de transmissão transplacentária (Hemphill *et al.*, 2000).

Alguns autores descrevem duas formas de contágio da transmissão transplacentária em ruminantes. Na transmissão transplacentária exógena a vaca é infectada durante a gestação por ingestão de oocistos e estes se diferenciam em taquizoítos, onde seguem para o útero, atravessam a placenta e infectam o feto. Já a transmissão transplacentária endógena ocorre da reativação de uma infecção persistente na vaca gestante (Trees e Williams, 2005; Williams, Ebel e Wells, 2009).

Os casos mais graves de neosporose ocorrem em cães jovens infectados por transmissão vertical, expressando-se por severo comprometimento neuromuscular. Em bovinos, apesar da doença ser causadora de abortamentos (Dubey e Lindsay, 1996; Dubey 1999; Innes *et al.*, 2005b), esse parasito pode também causar alterações neuromusculares em bezerros, destruindo grande quantidade de células nervosas, inclusive no sistema nervoso central, comprometendo a função das células remanescentes (Dubey e De Lahunta, 1993). Busca-se controlar o risco de transmissão de *N. caninum* para bovinos criados em sistemas de produção intensiva, protegendo alimentos e água da

contaminação por fezes de cães, bem como, eliminando animais mortos infectados ou restos fetais, para que cães não venham a ingeri-los, impedindo assim a continuidade do ciclo biológico (Gondim *et al.*, 2004a; Innes *et al.*, 2007).

Uma das principais incógnitas sobre a biologia de *N. caninum* é a frequência relativa com que os bovinos são infectados no pós-parto em relação aos infectados por transmissão transplacentária (Williams, Ebel e Wells, 2009). A única rota comprovada de transmissão de infecção pós-parto em bovinos é através da ingestão de oocistos esporulados (Gondim *et al.*, 2005). O número de oocistos encontrados nas fezes de cães infectados foi de 500.000 (Gondim *et al.*, 2005) a 24.000 oocistos (Schares *et al.* 2005). McCann *et al.* (2007) estimularam que a dose de 137 oocistos resultaram na infecção de 18 vacas, sendo que destas apenas uma abortou e outras quatro tiveram bezerros positivos, infectados por transmissão transplacentária, clinicamente normais. Finalmente, Williams, Ebel e Wells, (2009) concluíram que, quanto menor o número de oocistos excretados pelos cães, menor a incidência de aborto em vacas gestantes.

Bovinos infectados com o *N. caninum* têm 3 a 7 vezes mais probabilidade de abortar quando comparados com bovinos não infectados (Innes *et al.*, 2005b). Curiosamente, a transmissão transplacentária pode ocorrer em gestações consecutivas e novilhas infectadas podem transmitir o protozoário para sua prole. Esta transmissão vertical repetida observada em bovinos naturalmente infectados sugere que estes não desenvolvem facilmente a imunidade ao parasito, apresentando um desafio significativo para o desenvolvimento de um controle estratégico baseado na vacinação (Innes, 2005).

Entretanto, estudos realizados com bovinos demonstravam em fêmeas que sofreram um abortamento provocado pela neosporose diminuía a probabilidade de abortar novamente, quando estas entravam em contato com o mesmo protozoário (Anderson *et al.*, 1997; Wouda *et al.*, 1999), portanto isso sugere que o rebanho pode desenvolver um certo grau de imunidade protetora contra este agente infeccioso. Outra evidência para esta constatação surgiu de uma investigação de um surto da doença onde os animais que demonstraram ter uma evidência à exposição prévia ao *N. caninum* tinham menor probabilidade de

abortar em comparação com aquelas submetidas a uma infecção primária (McAllister *et al.*, 2000).

Infecções experimentais, com *N. caninum*, em ovinos durante a gestação demonstraram patologias semelhantes as dos bovinos (Buxton *et al.*, 1998). Entretanto infecções subseqüentes parecem estar controladas, demonstrando uma melhor resposta imunológica na infecção dessa espécie do que em bovinos (Buxton *et al.*, 1998; Buxton *et al.*, 2002). De maneira geral, a patogênese da neosporose depende do equilíbrio entre a capacidade de invasão e multiplicação do taquizoíto no hospedeiro e a habilidade que este possui para inibir a multiplicação parasitária (Williams *et al.*, 2000; Buxton *et al.*, 2002). Uma vez que em qualquer relação parasito-hospedeiro um vasto conjunto de respostas imunes podem causar patologia no hospedeiro e outros podem ser irrelevantes (Innes *et al.*, 2002).

1.3- Imunologia na neosporose

A resposta imune mediada por células desempenha um importante papel frente à infecção por *N. caninum* (Innes *et al.* 1995). O sistema imune do hospedeiro dispara seus mecanismos de resposta inata ao detectar o *N. caninum*, os quais envolvem a liberação de quimiocinas que recrutam e ativam leucócitos e que também estão envolvidas na regulação do processo inflamatório (Taubert, Zahner e Hermosilla, 2006). A resposta inata consiste na primeira linha de defesa de reconhecimento do patógeno por células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, que irão internalizar os microorganismos e através de enzimas líticas, conseguem eliminar o patógeno. A produção de citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da infecção permite o maior influxo das células imunológicas, responsáveis pela defesa do organismo, para o sitio inflamatório (Ostrowski *et al.*, 1999).

Células da resposta imune inata são responsáveis por influenciar a diferenciação de precursores de linfócitos T em Th1 ou Th2. A Interleucina -12 (IL-12) produzida por monocitos ou outras células apresentadoras de antígenos (APC) é o maior indutor da diferenciação em Th1, e conseqüentemente da imunidade celular. Essa citocina age juntamente com o interferon gama (IFN γ) produzido pelas células natural killer (NK), promovendo um aumento da resposta

Th1. As citocinas IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e IFN γ estimulam a síntese de óxido nítrico (NO) e outros mediadores inflamatórios que promovem uma resposta crônica (Chrousos, 2000).

Essa importância foi comprovada por Innes *et al.*, (2005a) onde observaram que células infectadas por *N. caninum*, tratadas *in vitro* com o IFN γ ou TNF α causaram inibição significativa da multiplicação do parasito intracelular.

Parasitas coccídeos são capazes de estimular uma resposta imune celular e humoral, bem como a síntese de IL-12 pelas células do sistema imune inato, induzindo produção local de IFN- γ . A presença de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-12 têm participação decisiva na resposta do hospedeiro frente ao parasito intracelular (Innes *et al.* 1995; Tuo *et al.*, 2005). Tuo *et al.*, em 2005, identificaram uma proteína no *N. caninum* (NcCyP) como um componente importante do citoesqueleto do parasito, responsável pela produção de IFN- γ e antígeno específico de células TCD4⁺ de bovinos. O IFN- γ e IL-12 são citocinas importantes na proteção natural contra a infecção mediada pelo *N. caninum*. Khan, Abadin e Rauf (1997) em seu estudo em ratos pré-tratados com anticorpos anti IFN- γ e tratados com anticorpos monoclonais anti IL-12, puderam constatar que estes animais morriam sete dias após a infecção. O mesmo foi observado por Nishikawa *et al.*, 2001, onde a total ausência de IFN- γ em ratos, os tornaram mais susceptíveis à neosporose. O tratamento com anticorpos utilizados para neutralizar as atividades do IFN- γ e IL-12, promovem maior susceptibilidade para a infecção por *N. caninum*. Portanto, a neosporose é fatal quando o hospedeiro infectado não possui uma resposta imune eficaz (Baszler *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000).

A produção do IFN- γ e IL-12 em resposta à exposição microbiana intracelular é fundamental para o desenvolvimento de uma imunidade protetora (Sher *et al.*, 2005). Durante a neosporose o IFN- γ , induzido por taquizoítos de *N. caninum*, desempenha um papel fundamental no controle da fase aguda da doença (Baszler *et al.*, 1999; Long e Baszler, 2000; Nishikawa *et al.*, 2003), por limitar a multiplicação do parasito (Marks *et al.*, 1998).

O IFN- γ se constitui na mais importante citocina ativadora de fagócitos, ativando neutrófilos a macrófagos, por linfócitos T (T CD4⁺ e T CD8⁺) e células natural killers (NK) (Brake, 2002; Williams, 2007). Estes atuam como primeira linha de defesa eliminando diretamente o parasito por fagocitose e também

produzindo intermediários reativos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e intermediários reativos do nitrogênio como óxido nítrico (NO), os quais são capazes de destruir protozoários intracelulares controlando assim a replicação parasitária (Denkers *et al.*, 2004; Coelho-Castelo *et al.*, 2009). Em 2001, Nishikawa *et al.*, demonstraram claramente o papel crucial do IFN- γ na ativação de macrófagos e resposta imune protetora contra *N. caninum*, conforme se verificou a partir da inibição de crescimento do parasito e produção de óxido nítrico. Pinheiro *et al.* (2006a) encontraram também um aumento na produção de óxido nítrico (NO) e elevação dos níveis de TNF- α em culturas de astrócitos de ratos, infectadas *in vitro* com *N. caninum*.

A infecção ambiental por oocistos de *N. caninum* ou a reativação de uma infecção crônica, leva ao rompimento de cistos teciduais e liberação de bradizoitos no tecido dos animais infectados, promovendo altos níveis de IFN- γ (Innes *et al.*, 2002; Jenkins, 2001). Entretanto, Yamane *et al.* (2000), observaram que a adição de IFN- γ em co-culturas de células gliais e neurônios obtidas de cérebro bovino, infectadas com taquizoítos, foi responsável pela inibição do crescimento parasitário. Recentemente, estudos utilizando culturas primárias de células gliais de ratos infectadas com esse parasito, apresentaram altos níveis de IL-10 e Interleucina-6 (IL-6), sugerindo o provável efeito regulador destas citocinas, na proteção do sistema nervoso, contra os efeitos deletérios de citocinas pró-inflamatórias (Pinheiro *et al.*, 2006a,b).

Contudo, o papel dos anticorpos na neosporose não está suficientemente esclarecido. Acredita-se que estes atuem em taquizoítos situados extracelularmente (Innes *et al.*, 2002). Em 2000, Tanaka *et al.* observaram que células TCD4⁺ eram essenciais para a produção de anticorpos específicos anti- *N. caninum* em estágios tardios de infecção, induzindo assim outros mecanismos de proteção. Cinco anos após, Spencer *et al.* (2005) comprovaram em animais que possuíam as células TCD8⁺ uma proteção maior ao parasito, quando comparadas com os animais com as células TCD4⁺, ao tentarem transferir imunidade protetora para camundongos infectados. Portanto, durante infecções agudas, células TCD8 agem primariamente como células citotóxicas limitando a disseminação do parasito, por reconhecimento direto de células infectadas pelo MHC classe I ou pela ação de citocinas. Um excesso deste tipo celular pode levar a uma

destruição exacerbada ou a liberação de citocinas levando a sinais neurológicos severos.

A resposta imunológica durante a gestação de bovinos se caracteriza de diferentes formas, dependendo do período gestacional. Se a infecção ocorrer durante o primeiro trimestre de gestação, muito provavelmente ocorrerá um abortamento (Barr *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 2000). Acredita-se que a ocorrência do abortamento provocada pela neosporose na fase inicial da gestação, deve-se a uma resposta imune ineficaz do feto. Em contrapartida, a mãe é capaz de uma resposta imune celular proliferativa forte, com produção de IFN- γ em resposta aos antígenos (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2002). Muito provavelmente, o abortamento ocorre pelos efeitos deletérios do IFN- γ sobre a gestação (Chaouat *et al.*, 1995; Innes *et al.*, 2005). Além desses efeitos negativos do IFN- γ , células T $\gamma \delta$, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ foram encontradas em infiltrados, na placenta de fêmeas parasitadas pelo *N. caninum* (Innes *et al.*, 2005). Caso ocorra no período intermediário, o feto pode ser abortado ou nascer doente. Infecções no último estágio da gravidez, no entanto, pouco predispõem ao abortamento, porém, em contrapartida, o neonato poderá apresentar neosporose, sem apresentar sintomatologia clínica (Innes *et al.*, 2002). Devido a esta importante resposta imune fetal, inúmeros estudos indicam que o momento da infecção do feto e da placenta é fundamental para o resultado da gestação (Buxton *et al.*, 1998; Quinn, 2004).

Dentre as citocinas envolvidas na defesa do hospedeiro, temos a interleucina-4 (IL-4), que estimula a multiplicação dos linfócitos B, produção de anticorpos e resposta do tipo Th2 (Entrican, 2002). A importância da IL-4 durante a gestação foi comprovada por Long e Baszler (2000) ao observarem uma diminuição da infecção transplacentária em ratos, quando estes eram infectados juntamente com anticorpos monoclonais para IL-4 e IL-10. Inicia-se uma resposta imunológica proveniente do feto e da placenta no terço médio da gestação, contribuindo assim para uma resposta do padrão Th2 no ambiente de comunicação entre o feto e a mãe (Innes *et al.*, 2002). A IL-10 regula negativamente os níveis de IFN- γ , compondo um mecanismo para reduzir a produção de níveis tóxicos de citocinas inflamatórias (Quinn, Miller e Ellis, 2004).

No terço final da gestação, o feto já apresenta uma maturidade do sistema imunológico e por isso, dificilmente a infecção provoca o abortamento, havendo

provavelmente uma mudança na dinâmica parasito/hospedeiro (Innes *et al.*, 2007). Estudos sugerem que a resposta Th1 compromete a gestação, enquanto a resposta Th2 localizada pode favorecê-la (Quinn, Miller e Ellis, 2004; Innes *et al.*, 2005). Portanto, o predomínio de um dos mecanismos de resposta resulta em um quadro crônico mantido por citocinas inflamatórias ou em reação inflamatória, dependendo do estado geral do animal infectado, da idade gestacional e da carga parasitária (Quinn, Miller e Ellis, 2004; Williams, Ebel e Wells, 2009). Para ilustrar a influência da idade fetal na severidade da doença, Collantes-Fernandez *et al.* (2008), observaram as lesões encontradas em fetos infectados com *N. caninum* e comprovaram serem estas mais graves a partir do primeiro e segundo trimestres de gestação em comparação com o terceiro trimestre.

2- Sistema nervoso central

O SNC é formado por uma estrutura complexa e heterogênia de tipos celulares, próximos entre si, como os neurônios e as células da glia. A proporção entre o número de neurônios e células da glia tem sido revista recentemente (Azevedo *et al.*, 2009; Seth e Koul, 2008). Estas últimas compreendem a maioria das células do SNC de vertebrados, correspondendo a 65% nos roedores e 90% em humanos. Elas circundam o corpo celular, dendritos e axônios dos neurônios, facilitando a sinalização entre eles, participando na separação e isolamento dos grupos neurais e conexões sinápticas, promovendo a fagocitose de fragmentos celulares após dano e morte neuronal, promovendo a defesa, além de participar da captação de nutrientes, oxigênio e homeostase do SNC (Tardy *et al.*, 1991; Kandel, Schwartz e Jessell, 2000; Barres e Bardes, 2000).

A princípio acreditava-se que as células gliais eram apenas responsáveis pela nutrição dos neurônios. Atualmente, constatou-se, entre outras funções, a participação dessas células na orientação do crescimento e da migração dos neurônios durante o desenvolvimento. As células gliais participam da comunicação entre as células neurais durante a vida adulta. Além disso, atua também na defesa e no reconhecimento das células em situações patológicas (Lent, 2001).

Divididos em 3 grupos principais, as células da glia se diferenciam em microglia, macroglia e células endoteliais (Hansson e Ronnback, 2003; Freeman, 2010). A macroglia, de origem neuroepitelial, inclui, os oligodendrócitos e astrócitos (Tardy, 1991). Os oligodendrócitos promovem maior eficiência na condução do estímulo nervoso, conferindo assim aos astrócitos e a microglia as duas principais populações de células reativas a danos neuronais e alterações no microambiente cerebral (Lent, 2001; Lent *et al.*, 2005). A microglia, de origem hematopoiética (derivadas do ectoderme), é composta por células consideradas imuno-efetoras, as quais apresentam atividade fagocítica semelhante a dos macrófagos, que são recrutadas após lesões, infecções, convulsões e doenças neurodegenerativas (Brown *et al.*, 1998; Chien e Veltter, 2005).

2.1- Astrócitos

Os astrócitos constituem cerca de mais da metade de toda a população glial (60-70% do total de células gliais). A depender da sua localização, diversos fenótipos e funções podem ser descritos, estando diretamente relacionado com o desenvolvimento, homeostasia e detoxificação do SNC (Tardy, 1991; Kandel, 2000, Pekny e Nilsson, 2005). Além disso contribuem ativamente para o suporte energético e para a resposta imune do SNC contra agentes químicos, infecciosos ou traumatismos (Letournel-Boulland *et al.*, 1994; Barres e Bardes, 2000, Pekny e Nilsson, 2005).

Os astrócitos são morfológicamente subdivididos em dois subtipos celulares: os protoplasmáticos (tipo I) e os fibrosos (tipo II), que se encontram na substância cinzenta e na substância branca, respectivamente (Lent, 2001; Rock *et al.*, 2004). Estas nomenclatura baseia-se apenas em distinções morfológicas, onde estas células apresentam prolongamentos a partir do corpo celular, os quais se ramificam formando uma densa rede de fino calibre (protoplasmáticos) ou de denso calibre (fibrosos), visto que não se conhecem diferenças funcionais entre eles (Figura 2) (Kriegstein e Gotz, 2003; Rock *et al.*, 2004).

Estas células compõem o revestimento interno da parede das cavidades intercerebrais e das meninges, formando uma proteção dos capilares sanguíneos do SNC, constituindo, dessa maneira, a base física da barreira hemato-encefálica

(BHE) (Iadecola, 2004; Kim *et al.*, 2006). Além de suas características morfo-funcionais, os astrócitos maduros têm sido identificados pela expressão da principal proteína do filamento intermediário do citoesqueleto, a proteína ácida do gliofilamento (GFAP), que é o marcador exclusivo desse tipo celular e a responsável pela forma típica destas células (Cajal, 1995; Kimelberg, 2007). O animal deficiente em GFAP apresenta uma deficiente organização da substancia branca, baixa eficiência na BHE e redução na formação de cicatrizes astrocitarias após lesão (Araque, 2006).

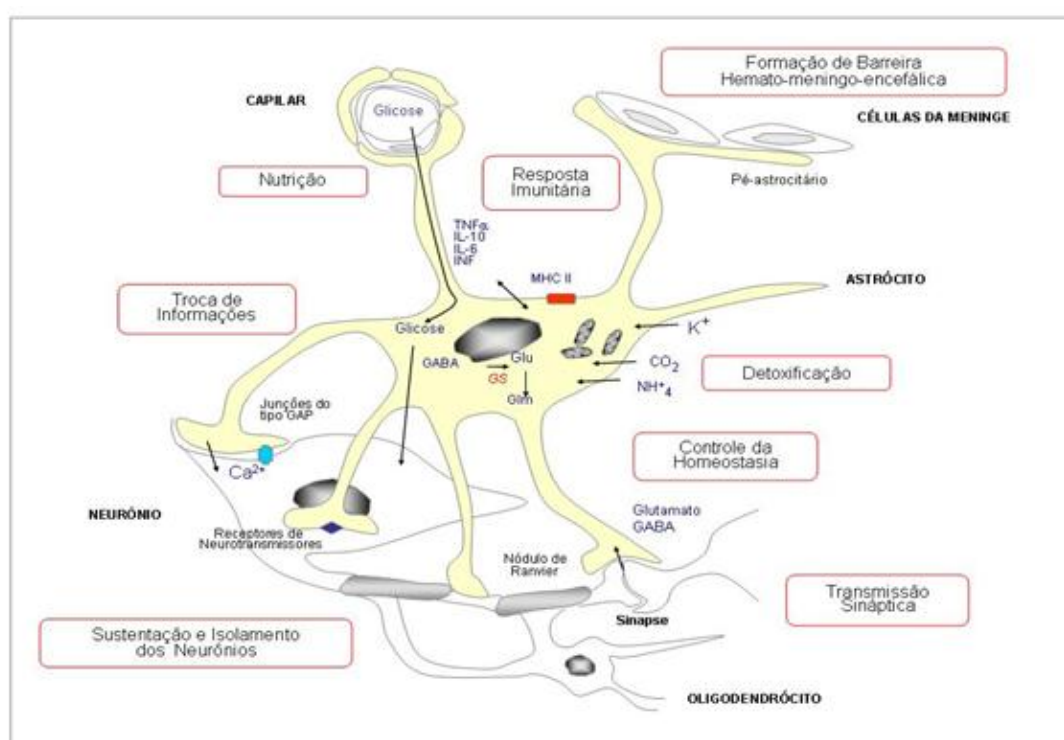


Figura 2- Representação esquemática das funções fisiológicas atribuídas aos astrócitos e correlações com outros tipos celulares (Adaptado de Tardy 1991; Van Wangoner e Benveniste, 1999)

Durante muito tempo os astrócitos foram considerados como células de apoio, cuja principal função seria o perfeito funcionamento neuronal. As células da glia estão diretamente relacionadas com a formação e armazenamento de glicose. Em situações de hipoglicemia ocorre liberação de glicose dessas células, garantindo assim o fornecimento de energia para os neurônios (Dienel e Cruz, 2006).

Além do fornecimento de glicose, os astrócitos desempenham diversas funções no desenvolvimento e na constituição do SNC, apresentando contato com diferentes tipos celulares. Os astrócitos participam ativamente desde o momento em que ocorre uma lesão no tecido nervoso, caracterizando a reatividade astrocitária, constituindo o fenômeno conhecido como astrogliose ou gliose. A presença abundante destas células em áreas lesadas no tecido nervoso constitui um processo análogo ao da reação inflamatória que ocorre em outros tecidos do organismo (Lent, 2001). Esse processo, caracterizado pela capacidade de proliferação juntamente com um aumento de expressão de GFAP promove o que se chama de cicatrização astrocitária. Os astrócitos ativos são capazes de secretar intensamente, diversas citocinas e fatores de crescimento interferindo no metabolismo e na sobrevivência neuronal (Rock *et al.*, 2004). Dentre estas funções, também participam do aporte energético aos neurônios, manutenção da homeostase extracelular e regulação da transmissão sináptica e neurogênese no adulto (Costa *et al.*, 2002; Nadarajah, 2003).

Os astrócitos são as primeiras células a responder a um ataque ou lesão no SNC (Norenberg, 1994). Considerados como importantes células de defesa, estas células são conhecidos como potentes produtoras de citocinas pró-inflamatórias (Iadecola, 2004; Kim *et al.*, 2006). São conhecidas por responder tanto a fatores inflamatórios, como imunes, desencadeando proliferação, liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão e apresentação de antígenos (Eddleston e Mucke, 1993; Norenberg, 1994). Demonstram também a capacidade de suprimir a ativação, proliferação e função efetora de células T invasoras, podendo também atuar como células apresentadoras de antígenos (Gimsa *et al.*, 2004). A cultura destas células constitui um modelo de estudo de fenômenos fisiopatológico do SNC, permitindo o entendimento dos mecanismos das células gliais na presença de parasitos (Costa *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2006).

2.2- Interação neurônio-glia

As interações neurônio-glia controlam diversos processos do desenvolvimento do sistema nervoso, como neuritogênese, formação de sinapses, migração neuronal, proliferação, diferenciação e sinalização neuronal

(Langle, Poulain e Theodosis, 2002; Hatton, 2002). Diversos fatores nessa interação estão implicados na morfogênese do sistema nervoso. Os astrócitos podem comunicar-se com outros astrócitos, ou com neurônios adjacentes pelo contato célula-célula, mediado por moléculas que constituem a matriz extracelular (MEC) e fatores solúveis secretados tanto pela glia quanto pelo neurônio, como neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento (Araque, 2006).

Os astrócitos são responsáveis pela produção da proteína glutamina sintetase. Esta enzima converte o glutamato em glutamina na presença de ATP e amônia, modulando a atividade elétrica neuronal e a transmissão sináptica (Perea e Araque, 2003; Seth e Koul, 2008). Isso permite remover a amônia neurotóxica e garantir o suprimento de glutamina, matéria-prima dos neurotransmissores glutamato (excitatório) e ácido γ aminobutírico (GABA-inibitório) fornecida aos neurônios. Em resposta aos neurotransmissores, os astrócitos apresentam um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (Perea e Araque, 2007; Nimmerjahn, 2009). Os astrócitos possuem uma forma de excitabilidade baseada em variações da concentração intracelular do Ca^{2+} e comunicam-se através de ondas de Ca^{2+} intercelulares. Além disso, neurotransmissores libertados sinapticamente são capazes de mobilizar Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares astrocitários, ou seja, a excitabilidade celular astrocitária é desencadeada pela atividade sináptica neuronal (Beattie *et al.*, 2002; Perea e Araque, 2007).

Trabalhos recentes apontam os astrócitos como importantes reguladores da neurogênese (Ma *et al.*, 2005), além disso, vários fatores neutróficos expressos e secretados por esta célula tem sido identificados (Barkho *et al.*, 2006). Os astrócitos são conhecidos por secretar fatores de crescimento, citocinas e mitógenos. Dentre esses fatores estão o fator de crescimento neural (NGF), o fator neutrófico derivado da glia (GDNF), o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), a IL-1 β e IL-6 (Barkho *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007; Seth e Koul, 2008).

As funções tróficas são mediadas pela interação com receptores específicos. No caso das neurotrofinas, seus mediadores interagem por meio de dois grupos distintos: receptores de cinase relacionados à tropomiosina (Trk) e receptores de neurotrofina ($p75^{NTR}$) (Lad *et al.*, 2003). As vias de sinalização utilizadas pelo receptor Trk induzem a respostas distintas, tais como a sobrevivência celular, diferenciação, formação de sinapse, plasticidade e crescimento axonal (Arevalo e

Wu, 2006; Freeman, 2010). Dentre estas vias esta a proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (Lad *et al.*, 2003; Arevalo e Wu, 2006). Esta via por sua vez, necessita de cálcio para potencialização da sensibilização terminal em neurônios sensoriais (Chuang *et al.*, 2001).

2.3- Células gliais e citocinas

O conceito corrente entre imunologistas sobre inflamação diz respeito ao balanço entre a produção de mediadores químicos e citocinas pró e antiinflamatórias. Estas substâncias atuam por meio de sinalização intercelular, determinando o desencadeamento ou a inibição dos processos inflamatórios (Figura 3) (Silva *et al.*, 2006). Este sistema de sinalização intercelular é muito ativo durante as doenças neurodegenerativas, infecciosas e em condições como traumatismo e isquemias do SNC, estando estas associadas ao aumento na expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Klein *et al.*, 2000; Venters, Dantzer e Kelley, 2000). A liberação de citocinas, como o TNF- α , são estímulos inflamatórios em resposta primária de macrófagos à patógenos (Tonks *et al.*, 2001). Em contrapartida, esta mesma citocina apresenta como principal função fisiológica o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para os sítios de infecção, onde, após serem ativados, promovem a destruição de microorganismos. Porém, quando produzida em grande quantidade, esta citocina provoca anormalidades clínicas e patológicas sistêmicas (Abbas, 2003).

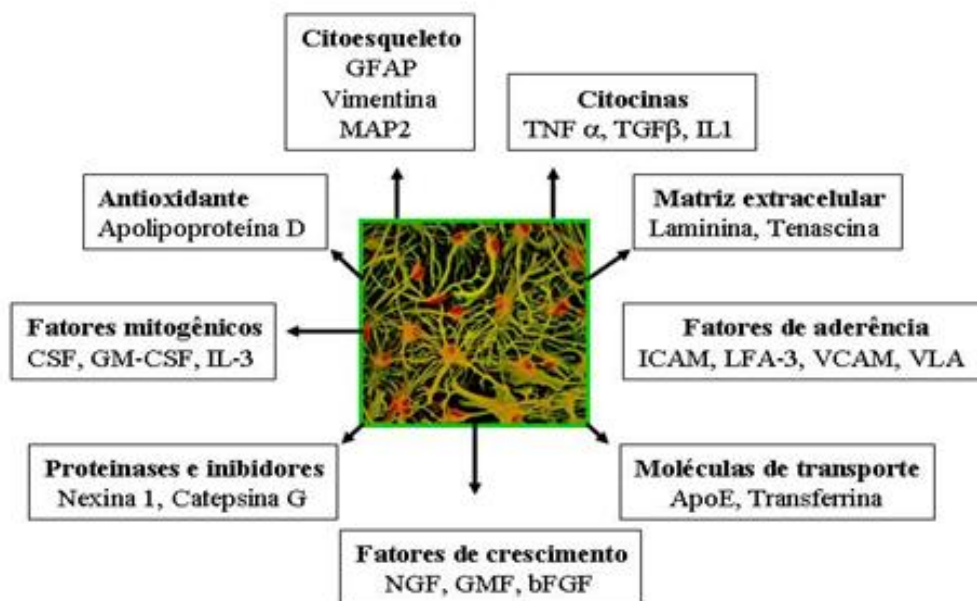


Figura 3- Principais peptídios e proteínas expressos por astrócitos reativos e seus papeis. (Adaptado de Noremborg 1994; Tardy 2001)

O TNF- α , associado ao INF- γ são responsáveis pela perda excessiva de peso na inflamação crônica, tornando-os mais eficientes e agressivos (Marks *et al.*, 1998; Entrican, 2002). No SNC o TNF- α apresenta diferentes efeitos em astrócitos, tais como proliferação, gliose e indução de outras citocinas, como IL-6 (Benveniste, Tang e Law, 1995; Van Wagoner e Benveniste, 1999). O TNF- α apresenta também a função de regular a resposta imune, modulando a expressão de MHC classe I e II em astrócitos e microglia (Benveniste, 1992).

Os níveis de IL-6 no SNC, em condições fisiológicas, são baixos. Entretanto, durante um processo patológico estes níveis começam a se elevar, podendo chegar a níveis de expressão ainda não completamente compreendidos (Van Wangoner e Benveniste, 1999). Sabe-se que a IL-6 é uma citocina imunorregulatória, com atividade pró e antiinflamatória e a sua falta pode interferir na resposta à infecção (Bolin *et al.* 2005). Consideradas benéficas ou destrutivas, as ações da IL-6 no SNC tem demonstrado que promove proliferação de astrócitos, acreditando-se que esta esteja envolvida com astrogliose. Entretanto, um excesso de sua expressão pode levar a neuropatias (Van Wangoner e Benveniste, 1999).

A IL-10 é produzida no SNC sob diversas condições inflamatórias ou desordens autoimunes, porém, a fonte celular de sua produção intracerebral não foi bem definida “*in vivo*” (Deckert-Schluter *et al.*, 1997), ainda que tenha sido descrita como produzida por microglia e por astrócitos no SNC (Sawada *et al.*, 1999). Muitas funções das células gliais são reguladas por diversas citocinas, a IL-10 é descrita apresentando um efeito imunossupressor (Benveniste *et al.*, 1995). Sabe-se que esta citocina inibe a produção de IFN- γ (Entrican, 2002), além de inibir a produção de mediadores da inflamação em células gliais tratadas com LPS (Ledeboer *et al.*, 2002). Outras funções da IL-10 envolvem uma retro-regulação da expressão de MHC classe II induzida por IFN- γ , a inibição da produção de TNF- α e IL-12, assim como a liberação de óxido nítrico (NO), por macrófagos (Deckert-Schluter *et al.*, 1997; Aloisi, Serafini e Andorini, 2001).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, de sinalização altamente reativa, gerada em ambiente endógeno, que se difunde rapidamente através das membranas celulares. Este participa em variadas ações fisiológicas e patológicas, incluindo neurotransmissão e inflamação (Zhou, 2006). É produzido em células neuronais, endoteliais, imunitárias e outras. A sua síntese ocorre por uma das três isoformas: sintetase neuronal (nNOS), sintetase endotelial (eNOS) e sintetase indutível ou macrófágica (iNOS) (Olensen, 2008).

Muitas células neuronais e particularmente células da glia são capazes de expressar a iNOS em quantidades até 1000 vezes as produzidas pela nNOS e eNOS (Olensen, 2008). Esta isoforma é independente do cálcio e exerce efeito citotóxico e citostático, não somente nas células patológicas, mas também em células saudáveis. Induzida por diversas células como fibroblastos, macrófagos e no epitélio do corpo ciliar, especialmente após liberação de TGF- β e estimulação por citocinas como IL-1 e TNF- α e lipopolissacarídeos (LPS), a iNOS conduziria a níveis elevados de NO (Berger e Savitz, 2008), uma vez que estes metabólitos afetam o crescimento dos microrganismos em diferentes períodos durante a fagocitose (Vazques-Torres *et al.*, 2000).

Orsi *et al.* (2000) observaram que o própolis promoveu o aumento na produção de NO e H₂O₂, associado ao aumento da atividade de macrófagos peritoneais de camundongos. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO

por longo tempo, e isso caracteriza seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, que deveria ser tóxico para microorganismos, parasitos ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes (Flora Filho e Zilberstein, 2000).

Outra citocina de grande importância no SNC é o TGF- β . Esta é reguladora de sinalização e diferenciação celular. Esta citocina controla diversos processos celulares incluindo proliferação celular, diferenciação, migração, apoptose, determinação da linhagem celular, produção de matriz extracelular e modulação da função imune (Vilar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). O principal mediador intracelular de sinalização do TGF- β são as proteínas Smad (Clark *et al.*, 2006). Estas estimulam a TGF- β a se concentrarem nos genes alvo, promovendo o reparo do tecido, com a regulação e a expressão de RNAm de várias espécies moleculares. Defeitos em sua sinalização levam a uma variedade de doenças, incluindo neoplasias (Kose *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

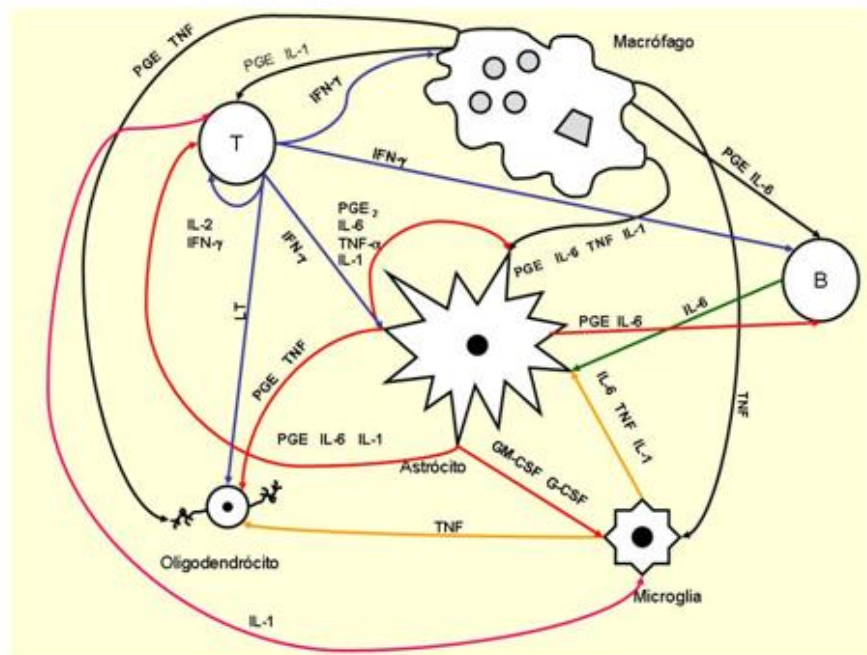


Figura 3- Interações das células gliais com o sistema imunológico (Adaptado de Tardy *et al.*, 2001; Bolin *et al.*, 2005).

3- Mel de abelha

No Egito antigo, o mel era o medicamento mais popular, participando de 500 dos 900 remédios da época, com registros decifrados. Primeira fonte de açúcar utilizado pelo homem, o mel era símbolo de fartura (Couto e Couto, 2002).

O mel é constituído de diferentes açúcares, predominando os monossacarídeos, glicose e frutose. Em sua composição há uma mistura complexa de carboidratos, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, vitaminas, sais minerais, pólen e outras substâncias (Weston e Brocklebank, 1999; Mendes *et al.*, 2009). Produto natural das abelhas, este é obtido a partir do néctar das flores. Seu conteúdo resulta das secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas (Campos e Modesta, 2000; Nagai *et al.*, 2006). A composição do mel pode variar dependendo de vários fatores, como a fonte de pólen, clima, condições ambientais e também as transformações que podem sofrer durante sua produção (Azeredo *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2006).

Considerado como o produto apícola mais fácil de ser explorado é também o mais conhecido tendo maiores possibilidades de comercialização. Além de ser um alimento, é também utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos, pela sua ação como antiinflamatório, antibiótico e outras conhecidas ações terapêuticas (Pereira *et al.*, 2003; Freitas, Khan e Silva, 2004).

As propriedades do mel de abelha são consideradas como fonte natural de saúde devido às suas qualidades terapêuticas (Silva *et al.*, 2004; Khan, Abadin e Rauf, 2007). Tem sido mencionado por suas variedades de propósitos medicinais e nutricionais (Molan, 2001; Khan, Abadin e Rauf, 2007) tais como: atividade antimicrobiana (Cooper, Molan e Harding, 1999; Snow e Manley-Harris, 2004; Gonçalves, Alves Filho e Menezes, 2005; Bobany *et al.*, 2010) protetor de mucosa contra doenças gastrointestinais (Prakash *et al.*, 2008), propriedades antioxidantes (Al-Mamary, Al-Meerri e Al-Habori, 2002; Aljadi e Kamaruddin, 2004), propriedades prebióticas (Roberfroid, 2000; Shan, 2001), além de propriedade antiinflamatória (Ansorge, Reinhold e Lendeckel, 2003; Han *et al.*, 2007) e modulatórias (Tonks *et al.*, 2003; Tonks *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2009), da resposta imunológica.

O mel de abelha é usado para tratamento de doenças respiratórias, urinárias, gastrointestinais, úlceras de córnea, úlceras de mucosas, psoríase e outras (Cooper e Molan, 1999; Al Waili, 2004a; Khan, Abadin e Rauf, 2007). Al Waili (2003ab), descobriu que o uso do mel aumentou os níveis sanguíneos de vitamina C, β -caroteno, ácido úrico, glutatona redutase, ferro sérico, cobre, zinco, hemoglobina e o hematócrito em indivíduos normais, reduzindo enzimas hepáticas, uréia, e os níveis de açúcar no sangue, em jejum. Além disso, o mel reduz as concentrações de estrogênio (E2), prostaglandina 2 α (PGF2 α), tromboxana (B2) no plasma de indivíduos normais.

O mel aumenta a concentração de NO na saliva de indivíduos normais e sua administração intravenosa e intrapulmonar promove melhoria das funções renal e hepática (Al Waili e Boni, 2003). Além de estimular a atividade da medula óssea e perfil lipídico (Al-Waili, 2004b). No sangue de ovinos testados, reduz a concentração de alanina amino transferase, aspartato amino transferase, triglicerídeos, colesterol, uréia e glicose, e eleva os níveis de proteínas séricas, albumina sérica, hemoglobina e contagem de células brancas (Al-Waili, 2004a). Portanto, o mel possui efeitos desejáveis em diversos parâmetros metabólicos (Al Waili, 2004b).

Além disso, existem relatos na literatura utilizando o mel como estimulador de resposta inflamatória em humanos. O mel apresenta uma ação mediadora de TNF- α , IL-6 e IL-1 em humanos (Tonks *et al.*, 2003). Entretanto, Ansorge, Reinhold e Lendeckel (2003), identificaram as propriedades antiinflamatórias do mel em células imune humanas, avaliando sua atividade antioxidante de radicais livres e ações excitatórias sobre a produção do TGF- β .

Em 2007, Han *et al.*, avaliaram o efeito do mel da abelha *Apis mellifera* sobre a produção de NO e TNF- α em células gliais, estimulados pelos lipopolissacarídeos (LPS). Observaram que o mel inibiu a produção de TNF- α . Esta inibição está estreitamente associada com a supressão de NO, podendo ser um poderoso regulador da inflamação e um potencial agente terapêutico contra doenças.

Tanto o mel como seus componentes isolados, a exemplo da própolis, estimulam a produção de citocinas inflamatórias (Khan, Abadin e Rauf, 2007).

Estas regulam o crescimento de linfócitos, suprimindo as citocinas pró-inflamatórias derivadas de Th1 e Th2, bem como, induzindo os linfócitos T reguladoras derivadas TGF- β (Sakaguchi, 2000).

O efeito modulador apresentado pelo mel, sobre a resposta imune em células de defesa, é observado por este possuir atividade mitogênica em células B e linfócitos T (Abuharfeil, Aloran e Aboshehada, 1999). O mel também é responsável por reduzir os efeitos dos reativos de oxigênio e limitar os danos aos tecidos, provocados pelos macrófagos ativados durante o processo de cicatrização (Tonks *et al.*, 2001)

Utilizado no tratamento de diversas enfermidades, o mel possui um efeito estimulante da resposta inflamatória. Este atua como mediador de citocinas, a exemplo do TNF, IL-6, IL-12 e IL-1 (Tonks *et al.*, 2003; Kohno *et al.*, 2004; Majtán *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2009). Acredita-se que existem várias espécies de abelhas que produzem diferentes méis com propriedades curativas específicas, sendo empregados para a cura de um amplo espectro de doenças (Bobany *et al.*, 2010).

Dentre as abelhas existentes no Brasil, além da *A. mellifera* introduzida por imigrantes europeus, são encontradas outras abelhas nativas indígenas, pertencentes a subfamília Meliponinae. Estas compreendem mais de 200 espécies diferentes e são popularmente conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (Castaldo e Capasso, 2002; Gonçalves, Alves Filho e Menezes, 2005). A abelha indígena *Tetragonisca angustula* tem porte pequeno e é popularmente conhecida como jataí. Sua distribuição geográfica é bem ampla, ocorrendo naturalmente nos Estados do Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Rio de Janeiro, Rondônia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. É uma das abelhas mais criadas no Estado de São Paulo. É possível obter de 0,5 a 1,5 L de mel/ano de colônias fortes. (Nogueira-Neto, 1997; Silveira, Melo e Almeida, 2002). Estas abelhas são facilmente adaptáveis e bastante mansas, podendo ser criadas racionalmente em áreas rurais ou urbanas. Como não apresentam ferrão, seu manejo é facilitado, dispensando o uso de equipamentos de proteção e possibilitando o emprego de mão de obra familiar (Lopes, Ferreira e Santos, 2005).

A Instituição Normativa 11, de 20 de outubro/2000 (Brasil, 2000) é quem regulamenta a padronização do mel para fins comerciais brasileiros. Esta regulamentação é baseada em legislações européias, atendendo apenas às características do mel de *A. mellifera*, não contemplando os méis de abelhas indígenas sem ferrão nativas do Brasil que apresentam diferenças em seus parâmetros físico-químicos. A umidade é a principal diferença, sendo esta bastante elevada e por conseqüência menos densa que o mel das abelhas africanizadas (Azeredo, Azeredo e Beser, 2000; Bezerra e Souza, 2002). Comparado com mel *A. mellifera*, as características mais relevantes do mel de meliponíneos são: maiores valores de água, acidez livre, condutividade elétrica, maltose e nitrogênio (Vit, Medina e Enriquez, 2004). Embora produza mel em pequenas quantidades, os meliponíneos fornecem um produto diferenciado do mel de *A. mellifera*, pela doçura e aroma inigualáveis, possuindo consumidores exigentes, dispostos a pagar altos preços pelo produto do mercado (Carvalho *et al.*, 2005; Souza, 2007; Souza *et al.*, 2009).

Ao comparar os méis produzidos pelas abelhas *T. angustula* e as abelhas *A. mellifera* no estado do Mato Grosso do Sul, Conti *et al.* (2007) utilizaram, para esta comparação, análises físico-químicas e relataram que o mel de jataí mostrou-se mais aquoso e mais ácido do que o mel de *A. mellifera*.

A meliponicultura tem despertado cada vez mais o interesse de produtores e pesquisadores. Este redescobrimento da atividade e sua valorização no mercado tem levado ao desenvolvimento de grande numero de estudos, voltados tanto para o conhecimento de aspectos da biologia e comportamento, como também, da caracterização dos produtos das colônias em relação a seus constituintes nutricionais e farmacológicos (Souza, 2007).

Existem alguns relatos científicos utilizando o mel de jataí (*T. angustula*) em apiterapia (Bijlsma *et al.*, 2006). Segundo Cortopassi-Laurino e Gelli (1984), este mel é utilizado em terapias populares, principalmente nas zonas rurais e entre indígenas. Além do seu valor alimentar, o mel da jataí também é procurado por suas propriedades medicinais. É considerado um alimento e medicamento dos mais completos e nutritivos (Lopes, Ferreira e Santos, 2005). O mel dessa abelha é mais líquido do que o mel de gênero *Apis* e é mais rapidamente absorvido quando passado na pele. Apresenta efeitos imunológicos, anti-inflamatório,

analgésico, sedativo, expectorante, hipossensibilizador e antibacteriano (Breyer, 1983).

O modo de ação do mel como agente antimicrobiano ainda não foi totalmente descoberto. Contudo já se sabe que componentes da osmolaridade, a acidez, a formação de agentes como peróxidos de hidrogênio e os fitoquímicos são substâncias importantes nesta ação antimicrobiana exercida pelo mel (Molan, 1992a). No mel natural a osmolaridade e a acidez, sem dúvidas, promovem o efeito inibitório sobre o crescimento microbiano. Quando muitos méis são diluídos em meio de cultura, uma enzima derivada da abelha, presente no mel é liberada. Esta enzima, a glicose oxidase, quando ativada induz a catalise produzindo o peróxido de hidrogênio, que inibe o crescimento bacteriano (White, Subers e Schepartz, 1963). Esta atividade varia consideravelmente de um mel para outro (Molan, 1992b). Suas propriedades medicinais e atividade microbiana estão geralmente relacionadas às suas características físicas e químicas (Molan, 1999).

Recentemente alguns autores utilizaram o mel de abelha indígena como agente terapêutico para combater infecções, o que demonstrou ter este uma nítida ação antimicrobiana. Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) observaram com sucesso a atividade antimicrobiana *in vitro* do mel da abelha indígena *Nannotrigona testaceicornis*, pertencentes a tribo Trigoni, a mesma das abelhas jataí, frente a diferentes microorganismos isolados de focos infecciosos. Enquanto Bobany *et al.* (2010) comprovaram a eficácia do mel de abelhas jataí em cultivo misto de bacilos, cocos e leveduras, os microorganismos mais encontrados do conduto auditivo de caninos domésticos acometidos por otite.

Particularmente nas sociedades onde há desigualdade social profunda, como no continente latino-americano, é alto o custo da medicina científica, dos exames sofisticados, das intervenções cirúrgicas complexas e dos equipamentos modernos de diagnóstico. A atual tendência mundial na busca de terapias alternativas no tratamento de doenças comuns vem do interesse em minimizar efeitos colaterais normalmente presentes nas terapias convencionais e da necessidade de recursos acessíveis à população (Avila-Pires, 1995; Luz, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; 2003 The control of T cell activation vs. tolerance. **Autoimmun. Rev.**, 2, 115-118p.

ABUHARFEIL N.; ALORAN R.; ABOSHEHADA M. 1999 The effect of bee honey on the proliferative activity of human B and T-lymphocytes and the activity of phagocytes. **Food and Agricultural Immunology** 11, n 2, 169-177p.

ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. 2004 Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chem.**, 85, 513-518 p.

ALVAREZ-MAUBECIN, V.; GARCIA-HERNANDEZ, F.; WILLIAMS, J. T.; VAN BOCKSTAELE, E. J.; 2000 Functional coupling between neurons and glia. **J Neurosci**, 20, 4091-4098p.

AL-WAILI, N.S.; 2004a Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. **Journal of Medicinal Food**, 7, 210-222p.

AL-WAILI, N. S.; 2004b Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. **Journal of Medicinal Food**, 7, 491-294p.

AL-WAILI N.; 2003a Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood minerals and enzymes levels in normal individuals. **Journal of Medicinal Food**, 6, 135-142p.

AL-WAILI N.; 2003b Topical application of natural honey, beeswax and olive oil mixture to treat patients with atopic dermatitis or psoriasis: partially controlled single-blinded study. **Complement Ther Med**, 11, 226-234p.

AL-WAILI N, BONI N.; 2003 Natural honey lowers plasma prostaglandins concentrations in normal individuals. **Journal of Medicinal Food**, 6, 129-133p.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. 2002 Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutr. Res.**, 22, 1041-1047 p.

ALOISI, F., SERAFINI, B., ADORINI, L., 2001. Glia-T cell dialogue. **Journal of Neuroimmunology** 107, 111-117p.

ANACLETO, D. A.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; 2009 Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* latreille, 1811). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29, n 3, 535-541p.

ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; PEREIRA, A. R.; OSHIRO, L. M.; CUNHA, R. C.; FIGUEIREDO NETO, L.F.; 2010 Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ver. Brás. Parasitol. Vet.**, 19, n 2, 119-123p.

ANDERSON, M., REYNOLDS, J. P., ROWE, J. D., SVELON, K. W., PACKHAM, A. E., BARR, B. C., CONRAD, P. A., 1997 Evidence of vertical transmission of *Neospora sp.* Infaction in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Association**, 210, 1169-1172p.

ANSORGE S, REINHOLD D, LENDECKEL U. 2003 Propolis and some of its constituents downregulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGFbeta1 production of human immune cells. **Z Naturforsch**, 58, 580-589p.

ARAQUE, A.; 2006 Astrocytes-neuron signaling in the brain-implications for disease. **Curr Opin Investig Drugs**, 7, 619-624p.

AREVALO, J. C.; WU, S. H.; 2006 Neurotrophin signaling: many exciting surprises. **Cell Mol Life Sci**, 63, 1523-1537p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - A.O.A.C. 1998 **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington.

ATAGO Co. 1988 Refratômetro para mel. **Abelhas**, v. 31, n. 362/363, 9, 11-12, 41-44p.

ÁVILA-PIRES F. D.; 1995 Teoria e prática das práticas alternativas. **Rev Saúde Pública**. 29, 2, 147-151p.

AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; BESER, L. B. de O. 2000 Características físico-químicas de amostras de méis de melíponas coletadas no Estado de Tocantins. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13, 2000. **Anais...** Florianópolis: Confederação Brasileira de Apicultura. CD-ROM.

AZEREDO L DA C, AZEREDO MAA, DE SOUZA SR, DUTRA VML. 2003. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chem** 80, 249-54p.

AZEVEDO, F. A.; CARVALHO, L. R.; GRINBERG, L. T.; FARFEL, J. M.; FERRETTI, R. E.; LEITE, R. E.; JACOB, F.W.; LENT, R.; HERCULANO,-HOUZEL, S.; 2009 Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain na isometrically scaled-up primate brain. **J Comp Neurol**, 513, 532-541p.

AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F.; ALVES, C. J.; GUIMARÃES FILHO, A. A.; OLIVEIRA, R. M.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; GENNARI, S. M.; 2010 Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 19, n 2, 80-84p.

BARKHO, B. Z.; SONG, H.; AIMONE, J. B.; SMART, R. D.; KUWABARA, T.; NAKASHIMA, K.; GAGE, F. H.; ZHAO, X.; 2006 Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. **Stem Cells Dev**, 15, 407-421p.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A.; 1993 Congenital *Neospora* infection in calves from cows that had previously aborted **Med Assoc** 202, 113-117p.

BARRES, B. A.; BARDE, Y. A.; 2000 Neuronal and glial cell biology. **Current Opinion in Neurobiology**, 10, 642-648p.

BARTELS C. J.; ARNAIZ-SECO J. I.; RUIZ-SANTA-QUITERA A.; BJORKMAN C.; FROSSLING J.; VON BLUMRODER D.; 2006 Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. **Vet Parasitol.**, 137, n 1-2, 17-27p.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DUBEY, J. P.; 2001 First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, 87, n.3, 612-618p.

BASZLER T. V.; LONG M. T.; MCELWAIN T. F.; MATHISON B. A.; 1999 Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **Int J Parasitol.** 29, 1635-1646p.

BEATTIE, E. C.; STELLWAGEN, D.; MORISHITA, W.; BRESNAHAN, J. C.; HA, B. K.; VON ZASTROW, M.; BEATTIE, M. S.; MALENKA, R. C.; 2002 Control of synaptic strength by glial TNFalpha. **Science**, 295, 2282–2285p.

BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; SANTOS, T. R.; TONIOLLO, G. H.; COSTA, A. J.; MINEO, J. R.; LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, M. G.; 2008 Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região do Sudoeste do estado de Mato grosso. **Revista brasileira de Parasitologia Veterinária**, 18, 29-33p.

BENEVISTE, E. N.; 1992 Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. **Neuroimmunoendocrinology**, 52, 106-153p.

BENVENISTE, E. N.; TANG, L. P.; LAW, R. M.; 1995 Differential regulation of astrocyte TNF-a expression by the cytokines TGF-b, IL-6 and IL-10. **Int J Dev Neurosci**, 13, 341-349p.

BERGER S, SAVITZ S. 2008 Deleterious role of THFalpha in retinal ischemiareperfusion injury. **IOVS**, 49, n 8, 3605-3610p.

BEZERRA, J. A.; SOUZA, E. 2002 A rainha do sertão. **Revista Globo Rural**, ano 17, n 202, 62-69 p.

BIJLSMA, L.; BRUIJN, L.L.M.; MARTENS, E.P.; SOMMEIJER, M.J. 2006 Water content of stingless bee honey (Apidae, Meliponini): Interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**, 37, 480-486p.

BJERKAS, L.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. 1984 Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, 70, 271-274p.

BOLETIN OFICIAL ESPAÑOL (BOE). 1986 Orden de 12 de junio de 1986, de la Presidencia del Gobierno por la que se a prueban los métodos oficiales de análisis para la miel. Madrid. N.145

BOLIN L, M.; ZHAUNG, A.; STRYCHKARSKA-ORCZYK, I.; NELSON, E.; HUANG, I.; MALIT, M.; NGUYEN, Q.; 2005 Differential inflammatory activation of IL-6 (-/-) astrocytes. **Cytokine**, 30, 47-55p.

BOBANY, D. M.; PIMENTEL, M. A. P.; MARTINS, R. R. C.; NETTO, B. E. de S.; TOLLA, M. S. de; 2010 Atividade antimicrobiana do mel de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) em cultivo de microrganismos do conduto auditivo de caninos domésticos (*Canis familiaris*) **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, 11, n 2, 441-446p.

BRAKE, D.A.; 2002. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. **Int. J. Parasitol.** 32, 509-510p.

BRASIL 2000. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa 11. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial**, 20 de outubro de 2000. Disponível em:http://www.engetecno.com.br/legislacao/mel_mel_rtfiq.htm. Acesso em: 24 Abril 2010.

BRESCIANI, K. D. S.; GENNARI, S. M.; SERRANO, A. C. M.; RODRIGUES, A. A. R.; UENO, T.; FRANCO, L. G.; PERRI, S. H. V.; AMARANTE, A. F. T.; 2007 Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitology Research**, 100, 281-285p.

BREYER, E.U.; 1983 **Abelhas e saúde**. 3. Ed. Santa Catarina: Uniporto, 80p.

BROWN, D. R.; BESINGER, A.; HERMS, J. W.; KRETZSCHMAR, H. A.; 1998 Microglial expression of the prion protein. **Neuroreport**, 9, 1425-1429p.

BUXTON D.; CALDOW G. L.; MALEY S. W.; MARKS J.; INNES E. A.; 1997 Neosporosis and bovine abortion in Scotland. **Vet Rec.**, 141, n 25, 649-651p.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; 2002 The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitol.**, 18, 546-552p.

BUXTON D.; MALEY S. W.; WRIGHT S.; THOMSON K. M.; RAE A. G.; INNES E. A.; 1998 The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Vet Res.**, 29, 289-310p.

CABELL, E.; 2007 Bovine abortion: aetiology and investigations. **In Practice**, 29, 455-463p.

CAJAL, S.R. Histology of the Neurons System of Man and Vertebrates. 1995 **Oxford University Press**.

CALDOW, G.; GRAY, D.; 2004 Fetal loss. In FORTUNATO, M. C. S.; GUERREIRO, D. S.; STILWELL, G.; 2010 *Neospora caninum* como causa de aborto bovino em explorações leiteiras. **Ver. Vaca Leiteira**, Ano XVIII, Número 111, Abril/Junho 2010.

CAMPOS, G.; MODESTA, R. C. D. 2000 Diferenças sensoriais entre mel floral e mel de melato. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59, n. 1-2, 7-14p.

CAÑON-FRANCO, W. A.; YAI, L. E. O.; JOPPERT, A. M.; SOUSA, C. E.; D'AURIA, S. R. N.; DUBEY, J. P.; GENNARI, M.; 2003 Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the rodent capybara (*Hydrochoeris hydrochoeris*) from Brazil. **Journal of Parasitology**, 89, 850p.

CARMICHAEL, J.; DE GRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B.; 1987 Evaluation of a Tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res.**, 47, 936p.

CARVALHO, C. A. L. de; MORETI, A. C. de C. C.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M. O.; 2005 Mel de abelha sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/**SEAGRI-BA**, 32p.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F.; 2002 Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 73, 1-6p.

CHAOUAT, G.; MELIANI, A. A.; MARTAL, J.; RAGHUPATHY, R.; ELLIOTT, J. F.; MOSMANN, T.; WEGMANN, T. G.; 1995 IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. **J Immunol**. 154, 4261-4268p.

CHIEN, C. B.; VELTER, M. L.; 2005 Developmental neurobiology: a 2005 perspective. **Dev Dyn**, 234-453p.

CHUANG, S. C.; BIANCHI, R.; KIM, D.; SHIN, H. S.; WONG, R. K.; 2001 Group I metabotropic glutamate receptors elicit epileptiform discharges in the hippocampus through PLCbeta1 signaling. **J Neuro Sci**, 21, 6387-6394p.

CLARKE, D. C.; BETTERTON, M. D.; XUEDONG L.; 2006 Systems theory of Smad signaling. **IEE Proc. Syst. Biol**. 153, 412-424p.

COELHO-CASTELO, A.A.M.; TROMBONE, A.P.F.; ROCHA, C.D.; LORENZI, J.C.C.; 2009 Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, 42, n-2, 127-142p.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., GÓMEZ-BAUTISTA, M., MIRÓ, G., ÁLVAREZ-GARCÍA, G., PEREIRA-BUENO, J., FRISUELOS, C., ORTEGA-MORA, L.M. 2008 Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. **Veterinary Parasitology**, 152, 148-151p.

CONTI, R.; RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A. 2007 Avaliação microbiológica e físico – química de méis de jataí (*Tetragonisca angustula*) e de *Apis mellifera* do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, 21, n 148, 91-96p.

COOPER, R.;A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G.; 2002. The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. **J Appl Microbiol** 93, 857-863p.

COOPER, R; MOLAN, P. C.; 1999 The use of honey as an antiseptic in managing pseudomonas infection. **J. Wound Care**, 8, n 4, 161-164p.

COOPER, R. A.; MOLAN, P. C.; HARDING, K. G. 1999 Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. **J. R. Soc. Med.**, 92, 283-285p.

CORBELLINI L.G.; DRIEMEIER D.; CRUZ C. F. E.; GONDIM L. F. P.; WALD V.; 2002 Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 103, 195-202p.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S.; 1991 Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. **Apidologie**, 22, 61-73p.

CORTOPASSI -LAURINO, M. E.; GELI, D. S.; 1984 Propriedades antibacterianas de méis brasileiros. **Ciência e Cultura**, 36, n 7, 616p.

COSTA G. H. N.; CABRAL D. D.; VARANDAS N. P.; SOBRAL E. A.; BORGES F. A.; CASTAGNOLLI K. C.; 2001 Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ci. Agrárias**, Londrina, 22, n 1, 61-66p.

COSTA, S.; PLANCHENAU, T.; CHARRIERE-BERTRAND, C.; MOUCHEL, Y.; FAGES, C.; JULIANO, S.; LEFRANCOIS, T.; BARLOVATZ-MEIMON, G.; TARDY, M.; 2002. Astroglial permissivity for neuritic outgrowth in neuron–astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability. **Glia** 37, 105-113p.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; 2009 Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.**, 1, 3, 241-256p.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A.; 2002 **Apicultura**: Manejo e produtos. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 191p.

CHROUSOS, G.P.; 2000 The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. **Int J. Obes Relat Metab Disord**, 24 Suppl 2, S50.

DAMRIYASA, I. M.; BAUER, C.; EDELHOFER, R.; FAILING, K.; LIND, P.; PETERSEN, E.; SCHARES, G.; TENTER, A. M.; VOLMER, R.; ZAHNER, H. 2004 Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocysts spp.* and *Neospora caninum* in sows. **Veterinary Parasitology**, 126, 271-286p.

DECKERT-SCHLUTER, M.; BUCK, C.; WEINER, D.; KAEFER, N.; RANG, A.; HOF, H.; WIESTLER, O. D.; SCHLUTER, D.; 1997 Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma* encephalitis. **J. Neuroimmunol.**, 76, n 1-2, 167-176p.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A.; DEL RIO, L.; BENNOUNA, S.; 2004 Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. **International Journal for Parasitology**, 34, 411-421p.

DE SOUZA S. L.; GUIMARÃES J. S. JR; FERREIRA F.; DUBEY J. P.; GENNARI S. M.; 2002 Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. **J Parasitol.** 88, 408-409p.

DIENEL, G. A.; CRUZ, N. F.; 2006 Astrocyte activation in working brain: energy supplied by minor substrates. **Neurochem. Int.** 48, 586-595p.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; WOUDA, W.; 2001 Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **Int J Parasitol.** 31, 209-215p.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A.; 1988a Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association** 192, 1269-1285p.

DUBEY, J. P.; 2003 Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, 41, 1-16p.

DUBEY, J. P.; 1999 Recent advances in *Neospora* and Neosporosis. **Veterinary Parasitology**, 84, 349-367p.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; 1996 A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, 67, 1-59.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M.; 2007 Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical and Microbiological Reviews** 20, 323-367p.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDDAY, W.; 2006 Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **J. Comp. Path.**, 134, 267-289p.

DUBEY, J. P.; DE LAHUNTA, A.; 1993 Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. **Appl. Parasitol.** 34, 532-534p.

DUBEY, J.P. 2003 Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean J. Parasitol.**, 41, 1-16p.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S.; 2002 Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int J Parasitol.**, 32, 929-946p.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L.; 1993 Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, 54, 15-36p.

ELENI C.; CROTTI S.; MANUALI E.; COSTARELLI S.; FILIPPINI G.; MOSCATI L.; MAGNINO S.; 2004 Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. **Veterinary Parasitology**, 123, 271-274p.

ENTRICAN, G.; 2002 Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infections abortion. **J Comp Pathol.**, 126, n. 2-3, 79-94p.

FARIA, E. B.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, M. L. C. R.; AZEVEDO, S. S.; 2007 Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, 149, 126-129p.

FERROGLIO, E.; GUIISO, M.; PASINO, M.; ACOSSATO, A.; TRISCIUOGLIO, A.; 2005 Antibodies to *Neospora caninum* in stray cats from North Italy. **Veterinary Parasitology**, 123, 161-166p.

FIGLIUOLO L. P. C.; RODRIGUES A. A. R.; VIANA R. B.; AGUIAR D. M.; KASAI N.; GENNARI S. M.; 2004a Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Rumin. Res.**, 55, 29-32p.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B.; 2000 Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil**, 46, n 3, 265-271p.

FIGLIUOLO L. P. C.; KASAI N.; RAGOZO A. M. A.; DE PAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M.; 2004b Prevalence of anti-*Toxoplasma*

gondii and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 123, 161-166p.

FORTUNATO, M. C. S.; GUERREIRO, D. S.; STILWELL, G.; 2010 *Neospora caninum* como causa de aborto bovino em explorações leiteiras. **Ver. Vaca Leiteira**, Ano XVIII, Número 111, Abril/Junho 2010.

FREEMAN, M. R.; 2010 Review: Specification and morphogenesis of astrocytes. **Glia**, 330, 774-778p.

FREITAS, D. G. F.; KHAN, A. S.; SILVA, L. M. R. 2004 Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) no Ceará. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, 42, n 1, 171-188p.

FUJII, T. U.; KASAI, N.; NISHI, S. M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; 2001. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. **Veterinary Parasitology** 99, 331-334p.

FUKUDA, M.; KOBAYASHI, K.; HIRONO, Y.; MIYAGAWA, M.; ISHIDA, T.; EJIUGU, E. C.; SAWAI M.; PINKERTON, K. E.; TAKEUCHI, M.; 2009 Jungle Honey Enhances Immune Function and Antitumor Activity. **eCAM Advance**, 1-8p.

GIMSA, U.; OREN, A.; PADIYAN, P.; TEICHMANN, D.; BECHMANN, I.; NITSCH, R.; BRUNNER-WEINZIERL, M. C.; 2004 Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). **J Mol Med**, 82, 364-372p.

GONÇALVES , A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. 2005 Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivo Instituto Biológico**, 72, n 4, 455-459p.

GONDIM, L. F. P.; 2006 *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology** 22, 247-252p.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLIKA, D. E.; 2004a Coyotes (*Canis latrans*) are the definitive host of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, 34, 159-161p.

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; GAO, L. 2005 Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology** 134: 33-39.

GONDIM, L. F.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O.; JESUS, E. E.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDES, H. S.; ALMEIDA, M. A.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M. M.; 2001 Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, 101, 1-7p.

GONDIM L. F. P.; PINHEIRO A. M., ALMEIDA M. A. O. 2007 Frequência de anticorpos anti-*Neospora* em búbalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, 8, n 2, 92-96p.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO J. R. L. A.; HARITANI, M.; 1999a *Neospora caninum* infection in a aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Vet J.** 47, n 1, 35p.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. 1999b Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 86, 71-75p.

HAN, S.; LEE, K. G.; YEO, J. H.; KWEONA, H. Y.; WOO, S. O.; LEE, M. L.; BAEK, H. J.; KIM, S. Y.; PARK, K. K.; 2007 Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor- α production stimulated by LPS. **Journal of Ethnopharmacology**, 111, 176-181p.

HASSON, E.; RONNBACK, L.; 2003 Glial neuronal signaling in the central nervous system. **FASEB J**, 17, 341-348p.

HATTON, G. I.; 2002 Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. **Adv Physiol Educ**, 26, 225-237p.

HELMICK, B.; OTTER, A.; McGARRY, J.; BUXTON, D.; 2002 Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, 73, 187-189p.

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A.; 2006 Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, 133, n. 3, 261-278p.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F. J.; DE MEERSCHMAN, F.; ELLIS, J. T.; INNES, E. A.; MCALLISER, M. M.; ORTEGA-MOURA, L. M.; TENTER, A. J.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; WILLIAMS, D. J. L.; WOUDA, W. A.; 2000 European perspective on *Neospora caninum*. **Int J Parasitol** 30, 877-924p.

HILALI, M.; LINDBERG, R.; WALLER, T.; WALLIN, B.; 1986 Enigmatic cyst-forming sporozoon in the spinal cord of a dog. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 27, 623-625p.

HILALI, M.; ROMAND, S., THULLIEZ, P., KWOK, O. C., DUBEY, J. P., 1998 Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. **Veterinary Parasitology**, 28, 269-271p.

HOBSON, J. C.; DUFFIELD, T. F.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S. K.; LESLIE, K. E.; MCEWEN, B.; CRAMER, G.; PEREGRINE, A. S.; 2002 *Neospora caninum* serostatus and 89 milk production of Holstein cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 221, 1160-1164p.

HOBSON, J. C.; DUFFIELD, T. F.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S. K.; LESLIE, K. E.; MCEWEN, B.; PEREGRINE, A. S.; 2005 Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. **Veterinary Parasitology**, 127, 177-188p.

IADECOLA, C.; 2004 Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci**, 5, 347-360p.

INNES, E.A.; 2005 Immune responses to Neospora Caninum. **I Fórum Brasileiro de estudo sobre *Neospora caninum***. 12-14p.

INNES, E. A.; BUXTON, D.; MALEY, S.; WRIGHT, S.; MARKS, J.; ESTEBAN, I.; RAE, A.; SCHOCK, A.; WASTLING, J.; 2000 Neosporosis: aspects of epidemiology and host immune response. **Annals of the New York Academy of Science**, 916, 93-101p.

INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; BARTLEY, P.; MALEY, M.; BUXTON, D.; 2005a Immune responses to Neospora caninum and prospects for vaccination. **IX International Coccidiosis Conference**, 91-96p.

INNES, E. A.; PANTON, W. R.; MARKS, J.; TREES, A. J.; HOLMDAHL, J.; BUXTON, D.; 1995 Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. **J Comp Pathol.**, 113, 95-100p.

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A.; 2002 Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitol.** 18, 497-504p.

INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. E.; BUXTON, D. 2007 Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. **Vaccine**, 25, 5495-5503p.

INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; 2005b The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Vet Immunol Immunopathol.** 108, 29-36p.

IWAMA, S. **Coleta de alimentos e qualidade do mel de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae)**. São Paulo, 1977. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de Pão Paulo – USP.

JENKINS, M. C.; 2001 Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. **Veterinary Parasitology** 101, 291-310p.

KHAN, F. R.; ABADIN, Z. U. L.; RAUF N.; 2007 Honey: nutritional and medicinal value. **Intern J Clin Practice**, 61, n 10, 1705–1707p.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; 2000 Nerve cells and behavior. **Principles of neural science**. 4. ed. New York.

KIM, J. D., LIU, L., GUO, W., MEYDANI, M., 2006 Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. **J. Nutr. Biochem**, 17, 165-176p.

KIMELBERG H. K.; 2007 Supportive or information-processing functions of the mature protoplasmic astrocyte in the mammalian CNS? A critical appraisal. **Neuron Glia Biol**, 3, 181-189p.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A.; 2010 Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, 40, n 8, 945-950p.

KLEIN, P. E.; KLEIN, R. R.; CARTINHO, S. W.; ULANCH, P. E.; DONG, J.; OBERT, J. A.; MORISHIGE, D. T.; SCHLUETER, S. D.; CHILDS, K. L.; ALE, M.; MULLET, J. E.; 2000 A high-throughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. **Genome Res.**, 10, 789-807p.

KOEHLER, R. C.; GEBREMEDHIN, D.; HARDER, D. R.; 2006 Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. **J Appl Physiol**, 100, 307-317p.

KOHNO, K.; OKAMOTO, I.; SANO, O.; ARAI, N.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M.; 2004 Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 68, n 1, 138-145p.

KOSE, N.; ASASHIMA, T.; MUTA, M.; IIZASA, H.; SAI, Y.; TERASAKI, T.; NAKASHIMA, E.; 2007 Altered Expression of Basement Membrane-related Molecules in Rat Brain Pericyte, Endothelial, and Astrocyte Cell Lines after Transforming Growth Factor- β 1 Treatment. **Drug Metab. Pharmacokinet.**, 22, 4, 255-266p.

KRIEGSTEIN, G. W.; GOTZ, M.; 2003 Radial glia diversity: a matter of cell fate. **Glia**, 43, 37-43p.

LAD, L.; WANG, J.; LI, H.; FRIEDMAN, J.; BHASKAR, B.; ORTIZ, D. E.; MONTELLANO, P. R.; POULOS, T. L.; 2003 Crystal structures of the ferric, ferrous and ferrous-NO forms of the Asp140Ala mutant of human heme oxygenase-1: catalytic implications. **J Mol Biol**, 330, 527-538p.

LAI, A. E TODD, K. G.; Hypoxia-activated microglial mediators of neuronal survival are differentially regulated by tetracyclines. **Glia**, 53, 809-816p.

LANGLE, S. L.; POULAIN, D. A.; THEODOSIS, D. T.; 2002 Neuronal-glia remodeling: a structural basis for neuronal-glia interactions in the adult hypothalamus. **J Physiol Paris**, 96, 169-175p.

LEE, J. I.; KIM, I. H.; 2007 Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performances and the economic impact. **Journal of Veterinary Science**, 8, 283- 288p.

LEDEBOER, A.; BREVE, J. J.; WIERINCKX, A.; JAGT, V. D. S.; BRISTOW, A. F.; LEYSEN, J. E.; TILDERS, F. J.; VANDAM, A.M.; 2002 Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. **Eur. J. Neurosci.**, 16, 1175-1185p.

LETOURNEL-BOULLAND, M. L.; FAGES, C.; ROLLAND, B.; TARDY, M.; 1994 Lipopolysaccharides (LPS) upregulate the IL-1-mRNA and downregulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS)-mRNAs in astroglial primary culture. **Euro. Cytokine Network**, 5, n 1, 51-56p.

LENT, R.; UZIEL, D.; BAUDRIMONT, M.; FALLET, C.; 2005 Cellular and molecular tunnels surrounding the forebrain commissures of human fetuses. **J Comp Neurol**, 483, 375-382p.

LETOURNEL-BOULLAND, M. L.; FAGES, C.; ROLLAND, B.; TARDY, M.; 1994 Lipopolysaccharides (LPS) up-regulate the IL-1 mRNA and downregulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS)- mRNAs in astroglial primary culture. **Euro Cytokine Network**, 5, 51-56p.

LIMA, M. S., JR.; ANDREOTTI, R.; CAETANO, A. R.; PAIVA, F.; MATOS MDE, F.; 2007 Cloning and expression of an antigenic domain of a major surface protein (Ncp43) of *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 16, 61-66p.

LINDSAY, D.S.; 1998 Question: What is the economic impact of the disease? **Veterinary Exchange**, 20, n11, 13p.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B.; 1999 Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, 83, 327-333p.

LIVINGSTONE, M.; LONGBOTTOM, D.; 2006 What is the prevalence and economic impact of chlamydial infections in cattle? The need to validate and harmonise existing methods of detection. **The Veterinary Journal**, 172, 3-5p.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VAN DER VINNE, R.; PINCKNEY, R. D.; 2004 Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13, 103-109p.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; HOFFMANN, D. C. S.; DITTRICH, J. R.; 2006 Neosporose eqüina - revisão. **Archives of Veterinary Science**, 11, n 3, 1-10p.

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

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G.; 2005 Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, 2, n 4. Disponível em: <http://www.aspta.org.br/publique/media/artigo1v2n4.pdf>>. Acesso em: 24 Maio 2010.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUG, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193, 265-275p.

LUZ, M. T.; 2005 Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no Fim do Século XXI. **Revista de Saúde Coletiva**, 15, 145-176p.

MA, D. K.; SONG, H.; 2005 Glial influences on neural stem cell development: celular niches for adult neurogenesis. **Curr Opin Neurobiol**, 15, 514-520p.

MALAVAZZI, G. R.; LAKE, J. C.; DANTAS, P. E. C.; 2005 Efeito do mel e do soro autólogo na cicatrização do epitélio corneano em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, 68, n. 3. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abo/v68n3/24737.pdf> Acesso em: 25 Maio 2010.

MARKS, J.; LUNDEN, A.; HARKINS, D.; INNES, E.; 1998 Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4 T cells and immune sera from experimentally infected cattle. **Parasite Immunology**, 20, 303-309p.

MAJTÁN, J.; KOVACOVA, E.; BILIKOVA, K.; SIMUTH, J.; 2006 The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNF_ release. **Int. Immunopharmacol.** 6, 269-278p.

MCCANN, C. M.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P.; SMITH, R. F.; CRIPPS, P. J.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J.; 2007. *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **Int. J. Parasitol.** 37, 1631-1639p.

MELO, C. B.; LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I.; LEITE, R. C.; 2004 Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 119, n 2-3, 97-105p.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; MESQUITA, L. X.; MARACAJÁ, P.B.; 2009 As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, Caatinga (Mossoró,Brasil), 22, n.2, 07-14p.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M.; 1998a Dogs are the definitive host of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology** 28, 1473-1478p.

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

MCALLISTER, M. M.; BJORKMAN C.; ANDERSON-SPRECHER R.; ROGERS, D. G.; 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 217, 881-887p.

MODOLO, J. R.; STACHISSINI, A. V. M.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; BARROZO, L. V.; LEITE, B. L. S.; 2008 Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. **Pesq. Vet. Bras.**, 28, n.12, 122-124p.

MOLAN, P. C.; 2001 Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. **Bee World**, 82, n.1, 22-40p.

MOLAN, P.C.; 1992a The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. **Bee World** 73, 5-28p.

MOLAN, P.C.; 1992b The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. **Bee World**, 73, 59-76p.

MOLAN, P.C.; 1999 The role of honey in the management of wounds. **Journal of Wound Care** 8, 415-418p.

NADARAJAH, S.; 2003 The Kotz type distribution with applications. **Statistics**, 37, 341-358p.

NAGAI, T.; INOUE, R.; KANAMORI, N.; SUZUKI, N.; NAGASHIMA, T.; 2006 Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. **Food Chem**, 97, 256–62p.

NIMMERJAHN, A.; 2009 Astrocytes going live: advances and challenges. **J Physiol.**, 587, 1639p.

NISHIKAWA, Y.; INOUE N.; MAKALA L.; NAGASAWA H.; 2003 A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, 116, 175-184p.

NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA K.; INOUE N.; MAKALA L.; NAGASAWA H.; OTSUKA H.; MIKAMI T.; 2001. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 8, 811-816p.

NOGUEIRA-NETO, P.; 1997 **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis.

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

OKA, H.; EMORI, Y.; KOBAYASHI, N.; HAYASHI, Y.; NOMOTO, K.; 2001 Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of

macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. **International Immunopharmacology**, 1, 521-532p.

OLESEN J.; 2008 The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache. **Pharmacol Ther**, 120, n 2, 157-171p.

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J. M.; 2000 Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **J Venom Anim. Toxins**, 6, 205-219p.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ASP, S.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B. K.; 1999 Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **Journal of Physiology**, 515.1, 287-291p.

O'TOOLE, D.; JEFFREY, M.; 1987 Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **The Veterinary Record**, 121, 563-566p.

PAMPLONA, B. C. 1989 **Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas**. São Paulo,. 131p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

PARE, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K.; 1996 Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhod mortality. **Can J Vet Res.** 60, 133-139p.

PARISH, S. M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T. E.; WEIDNER, J. P.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D. P.; LEATHERS, C. W.; 1987 Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 191, 1599-1600p.

PARKINSON, T.; BARRET, D.; 2009 Veterinary control of herd fertility. In FORTUNATO, M. C. S.; GUERREIRO, D. S.; STILWELL, G.; 2010 **Neospora caninum como causa de aborto bovino em explorações leiteiras**. Rev. Vaca Leiteira, Ano XVIII, Número 111, Abril/Junho 2010.

PEKNY, M.; NILSSON, M.; 2005 Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**. 50, 427-434P.

PEREA, G.; ARAQUE, A.; 2007 Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. **Science** 317, 1083–1086p.

PEREIRA, F. DE M.; LOPES, M. T. DO R.; CAMARGO, R. C. R. DE; VILELA, S. L. DE O.; 2003 **Produção de mel**. Embrapa Meio-Norte, versão virtual. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em : 23 maio 2010.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G.; 2001 Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue

cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, 31, 1144-1148p.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; ALMEIDA, M. A.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M.F.D.; 2006a Astroglial cells in primary culture: a valid model to study *Neospora caninum* infection in the CNS. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 15, n.113, 243-247p.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; ALMEIDA, M. A.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. D.; 2006b *Neospora caninum*: infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. **Experimental Parasitology**, 112, n.3, 193-197p.

PRAKASH, A.; MEDHI, B.; AVTI, P. K.; SAIKIA U. N.; PANDHI P. E.; KHANDUJA K. L.; 2008 Effect of Different Doses of Manuka Honey in Experimentally Induced Inflammatory Bowel Disease in Rats. **Phytotherapy research Phytother. Res.** 22, 1511-1519p.

QUINN, H. E.; MILLER, C. M.; ELLIS, J. T.; 2004. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. **International Journal for Parasitology** 34, 723-732p.

ROBERFROID, D. M. B.; 2000 Prebiotics and probiotics: are they foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, 71, suppl., 1682-1687p.

ROCK, R. B.; GEKKER, G.; HU, S.; SHENG, W. S.; CHEERAN, M.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P, K.; 2004 Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev**, 17, 942-964p.

RODRIGUES, A. C. L.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. 2005 Análises de mel de *Apis mellifera* L. 1758 e *Tetragosnisga angustula* (Latreille, 1811) coletado em Piracicaba-SP. **Revista da Agricultura**, 73, n. 3, 255-262p.

ROMANELLI, P. R.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; OGAWA, L.; DEPAULA, V. S. O.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in veterinary Science**, 82, 202-207p.

SADREBAZZAZ, A., HADDADZAREH, H., SHAYAN, P., 2006 Seriprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in camels (*camelus dromedarius*) in Mashhad, Iran. **Parasiology Research**, 98, 600-601p.

SAKAGUCHI S.; 2000 Regulatory T cells: Key control- lers of immunologic self-tolerance. **Cell**. 101, 455-458p.

SALABERRY, S. R.; OKUDA, L.H.; NASSAR, A. F.; CASTRO, J.R.; LIMA-RIBEIRO, A. M.; 2010 Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in sheep flocks of Uberlândia country, MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 19, n 3, 148-151p.

SAWADA, T.; KATO, Y.; SAKAYORI, N.; TAKEKAWA, Y.; KOBAYASHI, M. 1999 Expression of the multidrug-resistance P-glycoprotein (Pgp, MDR-1) by endothelial cells of the neovasculature in central nervous system tumors. **Brain Tumor Pathol.** 16, n.1, 23-27p.

SETH, P.; KOUL, N.; 2008 Astrocytes, the star avatar: redefined. **J Biosci**, 33, 405-421p.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A. O.; BAUER, C.; CONRATHS, F. J.; 2005 Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi* and *Toxoplasma gondii* in faeces collectes from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, 35, 1525-1537p.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONRATHS, F. J.; 1998 The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, 80, 87-98.

SHAN, N. P. 2001 Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technol.**, 55, n.11, 46-56p.

SHER, A. C.; COLLAZZO, C.; SCANGA, D.; JANKOVIC, G.; YAP, J. A.; 2005 Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunol. Res.**, 27, 521-528p.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; 2004 Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, 8, n.2/3, 260-265p.

SILVA, R. A.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; COSTA, J. M. C.; 2006 Composition and therapeutic properties of bee honey. **Alim. Nutr.**, Araraquara, 17, n.2, 113-120p.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. 2002 **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 253 p.

SOUZA, B. de A.; MARCHINI, L.C.; ALVES, R.M.; CARVALHO, A.L. de; SODRÉ, G.da S. 2006b Caracterização físico-química de amostras de méis de *Tetragonisca angustula*, provenientes das regiões do litoral norte e metropolitana do Estado da Bahia. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA**, 16, 2006. **Anais...** Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura.

SOUZA, B. de A.; ROUBIK, D.; BARTH, O.; MARCHINI, L.C.; CARVALHO, A.L. de; SODRÉ, G.da S. 2006a Composición de la miel de abejas sin aguijón: Estableciendo requisitos de calidad. **Interciencia**, 31, n.12, 867-875p.

SOUZA, B. A.; 2007 Meliponicultura tradicional e racional. In: VIT, P.; SOUZA, B.A. (Org.). **Evaluación sensorial de miel de abejas sin aguijón**. Mérida: APIBA; CDCHT; Universidad de Los Andes. 17-24p.

SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; DIAS, C. T. S.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M.O.; 2009 Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29, n.4, 798-802p.

SNOW, M. J.; MANLEY-HARRIS, M. 2004 On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. **Food Chem.**, 84, n.11, 145-147p.

TANAKA, T. T.; HAMADA, N.; INOUE, H.; NAGASAWA, K.; FUJISAKI, N.; SUZUKI, T.; 2000 The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, 90, 183-191p.

TARDY, M.; 1991. Astrocyte et homéostasie. **Médecine/Sciences** 7, 799-804p.

TAUBERT, A.; ZAHNER, H.; HERMOSILLA, C.; 2006 Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. **Veterinary Parasitology**, 142, 214-222p.

TAYLOR, A. R.; ROBINSON, M. B.; GIFONDORWA, D. J.; TYTELL, M.; MILLIGAN, C. E.; 2007 Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. **Dev Neurobiol**, 67, 1815-1829p.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P.; 1989 Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 1, Issue 3, 205-209p.

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. 1996 Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, 57, p.1559-1562.

TONKS, A.; COOPER, R. A.; PRICE, A. J.; MOLAN, P. C.; JONES, K. P.; 2001 Stimulation of TNF- α release in monocytes by honey. **Cytokine** 14, 240-242p.

TONKS, A.J.; COOPER, R.A.; JONES, K.P.; BLAIR, S.; PARTON, J.; TONKS A.; 2003 Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. **Cytokine** 21, 242-247p.

TONKS, A. J.; DUDLEY, E.; PORTER, N. G.; PARTON, J.; BRAZIER, J.; SMITH, E. L.; TONKS, A. A.; 2007 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. **Journal of Leukocyte Biology**, 82, 242-247p.

TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. 1999 Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, 29, 1195-1200p.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J.; 2005 Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, 21, 558-561p.

TUÑÓN, M. J.; GARCIA-MEDIAVILLA, M. V.; SANCHEZ-CAMPOS, V.; GONZALEA-GALLEGO, J.; 2009 Potential of flavanoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. **Bentham Science**, 10, n 3, 256-271p.

TUO, W.; FETTERER, R.; JENKINS, M.; DUBEY, J. P.; 2005 Identification and Characterization of *Neospora caninum* Cyclophilin That Elicits Gamma Interferon Production. **Infection and Immunity**, 73, n.8, 5093-5100 p.

UZÊDA, R. S.; JESUS, E.E.V.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; GONDIM, L.F.P.; BARBOSA JR, H.V. 2005 Inquérito sorológico do *Neospora caninum* em caprinos do Estado da Bahia. I **Fórum Brasileiro de estudo sobre *Neospora caninum***. 69p.

UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; FERNÁNDEZ, S. Y.; AYRES, M. C. C.; GONDIM, L. F. P.; ALMEIDA, M. A. O.; 2007 Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. **Small Ruminant Research**, 70, n.2-3, 257-259p.

VALADAS, S.; MINERVINO, A. H.; LIMA, V.M.; SOARES, R. M.; ORTOLANI, E. L.; GENNARI, S. M.; 2010 Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-*Lashmania chagasi* in serum of dogs from Pará State, Amazon, Brazil. **Parasitol. Res.**, 107, n 2, 453-457p.

VAN WAGONER, N. J.; BENVENISTE, E. N.; 1999, Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. **J Neuroimmunol** 100, 124-139p.

VAZQUES-TORRES, A.; CARSON J. J.; MASTROENI, P.; ISCHIROPOULOS, H.; FANG, F. C.; 2000 Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis: I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. **J Exp Med**, 192, 227-236p.

VENTERS, H. D.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W.; 2000 A new concept in neurodegeneration: TNFalpha is a silencer of survival signals. **Trends Neurosci** 23, 175-180p.

VILLALOBOS, E. M. C.; UENO, T. E. H.; DE SOUZA, S. L. P.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; 2006 Association between the presence of serum antibodies against *Neospora spp.* And fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology**, 129, 253-257p.

VILAR, J. M.; JANSEN, R.; SANDER, C.; 2006 Signal processing in the TGF-beta superfamily ligand-receptor network. **PLoS Comput. Biol.** 2, e3. 10.1371/journal.pcbi.0020003.

VILLAS-BOAS, J. K.; MALASPINA, O.; 2005 Parâmetros físico-químicos propostos para controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**, n. 82, 6-16p.

VIT, P.; MEDINA, M.; ENRÍQUEZ, E.; 2004 Quality standards for medicinal use of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. **Bee World**, 85, 2-5p.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; 2008 Functional properties of honey, própolis and royal jelly. **J Food Sci**; 73, 117-23p.

VOGEL, F. S. F.; ARENHAR, S.; BAUERMANN, F. V. 2006 Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, 36, 1948-1951p.

WALKER B.; 2004 *Neospora caninum* infection in cattle, Agnote DAI-314, **Veterinary Officer New South Wales Agriculture**, Australia, Editora Gunnedah.

WANG, S. E.; HINOWB, P.; BRYCEA, N.; ESTRADA, A.M. W. L.; ARTEAGA C.L.; WEBB, G. F.; 2008 A mathematical model quantifies proliferation and motility effects of TGF- β on cancer cells. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, 200, 1-13p.

WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, L. K.; 1999 The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. **Food Chem.** 64, 33-37p.

WHITE J. R. J. W.; SUBERS, M. H.; SCHEPARTZ, A. I.; 1963 The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. **Biochim. Biophys. Acta**, 73, 57–70p.

WILLIAMS, M. S.; EBEL, E. D.; WELLS, S. J.; 2009. Population inferences from targeted sampling with uncertain epidemiologic information. **Prev. V. Med.**, 23-25p.

WILLIAMS, D. J.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R.F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P.J.; KELLY, D.F.; TREES, A.J.; 2000 *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**. 121, 347-358p.

WILLIAMS, D. J.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; ELLIS, J.; BJORKMAN, C.; REICHEL, M. P.; TREES, A. J.; 2007 Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. **Infect Immun.**, 75, n.3, 1343-1348p.

WON, J. G.; YOON, S. C.; KIM, S. W.; JEFFERSON, A.; DUTTON, E. G.; HOLBEN, B.; 2004 Estimation of direct radiative forcing of Asian dust aerosols with sun/sky radiometer and lidar measurements at Gosan, Korea, **J. Meteorol. Soc. Jpn.**, 82, 115-130p.

WOODS, L. W.; ANDERSON, M. L.; SWIFT, P. K.; SVERLOW, K. W.; 1994 Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 6, 508-510p.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J. M.; 1999 Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattles. **International Journal for Parasitology**, 29, 1677-1682p.

YAI, L. E. O.; CAÑÓN-FRANCO, W. A.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E.; CAMARGO, M. C.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; 2008 Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, 94, n.3, 766p.

YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMIZU, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; 2000. 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** 62, 347-351p.

YAMASHITA, R.; SUZUKI, Y.; WAKAGURI, H.; TSURITANI, K.; NAKAI, K.; 2006 DBTSS: DataBase of human transcription start sites, progress report. **Nucleic Acids Res**, 34, 86-89p.

ZHOU, R.; 2006 Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by (5R)-5-hydroxytryptolide in interferon-gamma- and bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **J Pharmacol Exp Ther.**, 316, n.1, 121p.

CAPITULO 1

REDUÇÃO NA PROLIFERAÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum* EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS DE RATOS TRATADAS COM MEL DE *Tetragonista angustula*

1. Artigo submetido ao comitê editorial da revista Veterinary Parasitology.

INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença mundialmente conhecida por induzir abortamentos em bovinos, além de promover alterações neuromusculares em cães (Gondim, 2006; Dubey, Schares e Ortega-Mora, 2007). Seu agente, o *Neospora caninum*, é responsável por perdas reprodutivas e econômicas em bovinos sendo os prejuízos causados por esta parasitose relevantes para a indústria agropecuária. Nos cães, o parasito é responsável por promover desordens neuromusculares (Dubey, 1999).

As alterações observadas no sistema nervoso de cães e bovinos recém nascidos é uma das principais manifestações clínicas da neosporose. Diante disso, Pinheiro *et al.* (2006a) descreveram um modelo de estudo *in vitro* de infecção do *N. caninum* em células do sistema nervoso central (SNC) de ratos, a fim de estudar os aspectos de sua patogenia e investigar a capacidade de resposta imune dessas células. Culturas de células gliais são consideradas um modelo de estudo válido para os fenômenos fisiopatológicos do SNC, permitindo o entendimento da resposta dessas células a agentes traumáticos ou infecciosos (Tardy, 1991).

Sabe-se que o SNC possui diferentes tipos celulares e que estes podem ser divididas em neurônios e células da glia. As células gliais constituem 90% das células do SNC dos humanos (Baumann e Pham-Dinh, 2001). Dentre as células da glia, os astrocitos participam diretamente da formação e armazenamento de glicogênio, garantindo assim o fornecimento de energia para os neurônios (Dienel e Cruz, 2006). Desta forma, contribuem ativamente para o suporte energético e auxiliam na resposta imune do SNC contra agentes químicos, traumáticos e infecciosos (Alvarez-Maubecin *et al.*, 2000; Barres e Bardes, 2000; Pekny e Nilson, 2005). Além disso, estas células são as primeiras a responder a ataques ou lesões no SNC, produzindo substanciais alterações no seu corpo celular que caracterizam astrogliose (Norenberg, 1994),

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica tem verificado o potencial terapêutico do mel de abelhas (Silva, Queiroz e Figueiredo, 2004). Esse produto apícola tem apresentado propriedades medicinais (Molan, 2001) como: atividade

antimicrobiana (Snow e Manley-Harris, 2004; Gonçalves, Alves Filho e Menezes, 2005; Bobany *et al.*, 2010), protetor de mucosas (Prakash *et al.*, 2008), propriedades antioxidantes (Al-Mamary, Al-Meerri e Al-Habori, 2002; Aljadi e Kamaruddin, 2004) e propriedades prebióticas (Roberfroid, 2000; Shan, 2001). Estudos têm utilizado o mel como um modulador da resposta imune. Alguns autores consideram que o mel tem propriedades antiinflamatórias (Ansorge, Reinhold e Lendeckel, 2003; Han *et al.*, 2007), enquanto outros descrevem o mel como um agente estimulante da resposta inflamatória (Al waili, 2003; Kohno *et al.*, 2004; Majtán *et al.*, 2006; Tonks *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2009). Molan (1992b e 1999) considera que as propriedades variam de um mel para o outro e que a essas são referentes às suas características físicas e químicas.

Em 2007, Han *et al.* avaliaram o efeito do mel da abelha social com ferrão *Apis mellifera*, espécie exótica introduzida no Brasil, sobre as células gliais e concluíram que o mel pode ser um poderoso regulador da inflamação e um potencial agente terapêutico contra uma série de doenças. Este mel de abelha do gênero *Apis* possui propriedades medicinais bastante conhecidas desde a medicina antiga (Couto e Couto, 2002). Sua ação antimicrobiana já foi comprovada, sendo uma alternativa de baixo custo financeiro (Malavazzi, Lake e Dantas, 2005; Gonçalves, Alves Filho e Menezes, 2005).

No Brasil existe um grupo de abelhas sociais sem ferrão com mais de 200 espécies, pertencentes à subfamília Meliponinae, e popularmente conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (Castaldo e Capasso, 2002; Gonçalves, Alves Filho e Menezes, 2005). Dentre essas espécies, a abelha jataí, *Tetragonisca angustula*, tem porte pequeno e suas colônias são encontradas em todas as regiões brasileiras (Lopes, Ferreira e Santos, 2005).

Existem poucos relatos utilizando o mel de abelha *T. angustula* em apiterapia (Bijlsma *et al.*, 2006). Segundo Cortopassi-Laurino e Gelli (1984), este mel é utilizado em terapias populares, principalmente nas zonas rurais e entre indígenas. O mel de *T. angustula* é mais líquido do que o mel de gênero *Apis*, por isso, é mais rapidamente absorvido quando aplicado na pele. Apresenta efeitos anti-inflamatório, analgésico, sedativo, expectorante, hipossensibilizador e antimicrobiano (Breyer, 1983; Bobany *et al.*, 2010).

O efeito antimicrobiano do mel de *T. angustula* em microorganismos também foi relatado. Bobany *et al.* (2010) e Miorin *et al.* (2003) observaram a existência de ação antibacteriana em isolados de secreção otológica de cães e isolados de infecções humana, respectivamente. Os resultados demonstram claramente uma ação do mel frente a *Staphilococcus sp.*, *Bacillus sp.* e leveduras. Diante disso, este estudo avaliou a ação do mel de *Tetragonisca angustula* em culturas de astrócitos de ratos, infectadas *in vitro* com *Neospora caninum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de astrócitos - córtex de ratos neonatos (< 48 h de vida), foram dissociados mecanicamente utilizando-se um filtro de 80µm e 2 x 10⁵ células foram distribuídas em placas de cultura de 20 milímetros (TPP- Switzerland). As culturas de astrócitos foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cultilab, Brasil) suplementados com 10% (v / v) de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), 1mM de ácido pirúvico (SIGMA) e 2mM de glutamina (SIGMA). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, com trocas regulares de meio a cada 48 horas (Costa *et al.*, 2002). Após 7 dias de cultura o meio foi suplementado com 1% de mel de *T. angustula*.

Cultura de *N. caninum* - Taquizoítos da cepa NC-Bahia (Gondim *et al.*, 2001) foram mantidas em células Vero, com mudanças regulares de meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino a cada 48 horas.

Obtenção do mel de *T. Angustula* - o mel foi coletado no meliponário do Núcleo de Estudo dos Insetos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). A coleta foi realizada diretamente dos potes de mel presentes no interior da colônia, por meio de uma seringa estéril, e acondicionado em frasco de vidro e mantido sob refrigeração até a sua utilização. O mel foi utilizado no mesmo dia da sua coleta. O mesmo foi filtrado, utilizando-se filtro de seringa 0,22 µm, diluído no meio de cultura DMEM, na proporção de 1% e foi utilizado a partir do 8º dia de cultura dos astrócitos.

Análises físico-químicas do mel de *T. Angustula* - Foram realizadas análises de umidade, cinzas, condutividade elétrica, pH e acidez. A umidade foi determinada após a colheita das amostras por refratômetro manual ATAGO,

específico para mel (luz natural, temperatura ambiente). O aparelho foi adaptado do refratômetro Abbé e dispõe de uma escala, que expressa o valor em Brix, a partir do qual foi calculado o valor da umidade (%). O teor de cinzas expressa a riqueza do mel em minerais, e constituem em parâmetro utilizado nas determinações que avaliam a qualidade do mel. O valor de cinzas foi determinado por meio de um condutivímetro (Tecnal HI8820), seguindo as recomendações do fabricante. O pH do mel refere-se aos íons de hidrogênio que determinam o estado de conservação do mel e a acidez promove a estabilidade frente ao desenvolvimentos de microorganismos. Os valores do pH e da acidez foram determinados segundo a metodologia da Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C., 1998). Para o estudo da condutividade elétrica utilizou-se a metodologia do Boletín Oficial Español (B.O.E., 1986), com um condutivímetro (Tecnal HI8820), seguindo as recomendações do fabricante.

Infecção das culturas de astrócitos- Os astrócitos foram infectados como descrito por Pinheiro *et al.* (2006a). Os parasitos foram purificados usando filtro de 5 µm (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) e contados em hematocitômetro. Foi utilizado uma relação célula:parasito de 1:1, para infecção das culturas. A infecção foi realizada no 15º dia de cultura, 8 dias após a suplementação do meio DMEM com 1% de mel. O tempo de infecção foi de 72h e após este os parasitos foram contados para verificar se o mel apresentou algum efeito sobre a multiplicação dos protozoários.

Efeitos tóxicos induzidos pela infecção - A toxicidade celular foi verificada pela dosagem de lactato desidrogenase (LDH) e a função mitocondrial determinada pelo método de conversão do MTT. A LDH é um marcador biológico enzimático estável, e sua concentração se correlaciona linearmente com a estabilidade de membrana (Pinheiro *et al.*, 2006). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 72 h após a infecção com *N. caninum*, centrifugado a 500g por 5 minutos. A atividade da LDH foi determinada utilizando um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Analisa Diagnóstica, Brasil). O método de conversão do MTT [3-(4,5 dimetiliazol-2yl)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo] em formazan (Carmichael *et al.*, 1987) baseia-se na redução do sal tetrazolato e foi utilizado para verificar o metabolismo mitocondrial. Foram adicionados 0,5 g/L de MTT as culturas, 2 horas antes do final das 72 horas do período de infecção. O meio foi removido e a concentração dos cristais de formazan dissolvidos em

dimethyl sulfóxido e quantificado a 580nm utilizando um espectrofotometro (FENTO 700 plus). Os resultados foram obtidos de 3 diferentes experimentos em triplicata e expressos em porcentagem da absorbância do controle.

Dosagens de Citocinas - Foram realizadas dosagens de IFN γ (R&D, USA) e TGF- β (Amersham, Reino Unido) nos sobrenadantes das culturas. Utilizou-se kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante. O sobrenadante foi coletado 72h após infecção e centrifugado a 50g por 5 minutos e mantidos a -80°C, até a realização dos testes. Os resultados foram expressos em pg/ml e normalizados com a concentração de proteína.

Dosagem de Proteínas - As células foram lavadas duas vezes com PBS, colhidas e lisadas em 2% (v / v) SDS, 2mM EGTA, 4 M de uréia, 0,5% (v / v) de Triton X-100, 62.5mm Tris -HCl (pH 6,8) suplementado com 0,1% (v / v) de um coquetel de inibidores de protease (Sigma, St. Louis, MO). O teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951) (Bio-Rad, Hercules, CA).

Dosagem de óxido nítrico - A quantidade de nitrito (NO $_2^-$) formado no sobrenadante das culturas foi usado como um marcador para a produção de óxido nítrico (NO) de acordo com o método de Griess (Won *et al.*, 2004). Resumidamente, os testes foram realizados em duplicatas. Alicotas dos meios de culturas (50 μ L), foram adicionados com igual volume 1:1 (v / v) em uma mistura de 1% sulfanilamida, 5% de ácido fosfórico e 0,1% N-etilenodiamina (1-naftil). A leitura foi realizada em uma absorbância de 490 nm usando um leitor de microplacas Universal Elx 800 (Biotek, Inc, EUA). As curvas padrões foram geradas em diluições seriadas do nitrito de sódio em meio de cultura.

Imunocitoquímica – as alterações morfológicas foram avaliadas pela imunomarcção da proteína ácida do gliofilamento (GFAP). O GFAP é o principal componente do glicofilamento e um marcador específico dos astrócitos. Os astrócitos foram fixados em metanol a -20°C por 20 minutos e bloqueados com BSA 3% por 1 hora. Em seguida foram marcados com anticorpo IgG anti-GFAP (DAKO, Dinamarca) diluído em 1:400 em PBS overnight em câmara úmida a 4°C e em seguida incubadas com anticorpo anti-IgG conjugado com tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC), (Cappel, Durham, Canadá) diluído a 1:400 a 37°C por 2 horas.

Immunoblotting - A expressão de GFAP foi avaliada por western immunoblotting. Um sistema de eletroforese descontínuo e desnaturante que

consiste na utilização de um gel de corrida contendo 12% de acrilamida e 4% de gel de empilhamento de acrilamida. Padrões de baixo e alto peso moleculares foram utilizados para calcular o valor RF (RF = Migração de proteínas padrão em cm / distância da migração do corante azul de bromofenol em cm). Utilizou-se uma concentração de proteína de 5 µg para a detecção de GFAP. A eletroforese foi realizada em 200 V por 45 min. O gel foi eletroforicamente transferido para uma membrana de PVDF. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas por 1 h em temperatura ambiente em 20 mM de salina Tris-tamponada (pH 7,5), contendo 0,05% Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado. Membranas foram incubadas com anticorpos IgG anti-GFAP de coelho numa diluição de 1:2.000 (DAKO, Dinamarca), overnight a 4°C. Em seguida, foram incubadas com conjugado anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina por 2 h em uma de diluição de 1:5.000 (Bio-Rad, Hercules, CA). As bandas imunorreativas foram reveladas utilizando um kit contendo substrato para fosfatase alcalina, processadas de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA).

Análise Estatística - Os resultados foram expressos com média ± desvio padrão (SD). As comparações entre os grupos foram feitas em análise de variância, utilizando o teste t Student, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Análises físico-químicas do mel de *T. angustula* - O valor de umidade encontrado no mel de *T. angustula* foi de 26,70%. Os valores de pH e acidez foram de 3,85 meq.kg⁻¹ e 88,00 meq.kg⁻¹, respectivamente. A condutividade elétrica encontrada foi de 1014,65 µS.cm⁻¹ e o valor de cinzas foi de 0,58%.

Efeito induzido pela infecção - Os níveis de atividade da LDH foram determinados para avaliar o aumento de permeabilidade de membrana celular dos astrócitos expostos aos tratamentos. Nas culturas tratadas com 1% de mel observou-se uma redução de mais de 50% da produção do LDH, em relação às culturas controle. As culturas infectadas com *N. caninum* e naquelas tratadas com 1 % de mel e infectadas com *N. caninum* ocorreu um aumento de 50% e de mais de 100%, respectivamente, quando comparado com o controle (Figura 1).

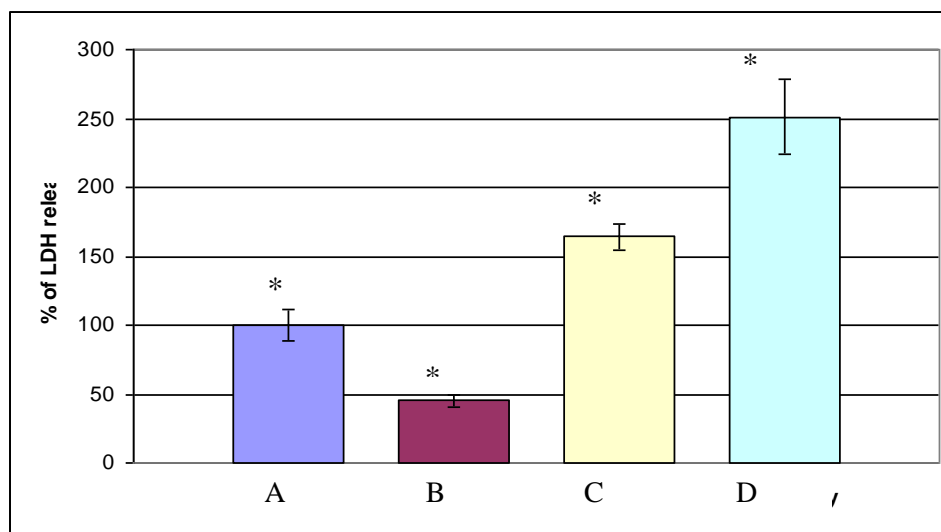


Figura 1 - Atividade da lactato desidrogenase no sobrenadante das culturas de astrocitos. A: controle; B: tratadas com 1% de mel; C: culturas infectadas com *N. caninum* e D: tratadas com 1% de mel e infectadas com *N. caninum*. * $p < 0.0001$.

O estudo do metabolismo mitocondrial foi realizado pelo teste de MTT. As culturas tratadas com 1% de mel apresentaram uma tendência de aumento no metabolismo mitocondrial em aproximadamente 40%, assim como, aquelas tratadas com 1% de mel e infectadas com *N. caninum*. Já as culturas infectadas com *N. caninum* apresentaram uma tendência de redução de 40% do metabolismo mitocndrial quando comparados com o controle (Figura 2). Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os controles e as culturas tratadas. Observou-se diferença de $p < 0,01$ quando se comparou os resultados das culturas infectadas com os parasitos e aquelas tratadas com 1% de mel e de $p < 0,05$ entre as infectadas com *N. caninum* e tratadas com 1% de mel com aquelas infectadas com o *N. caninum*.

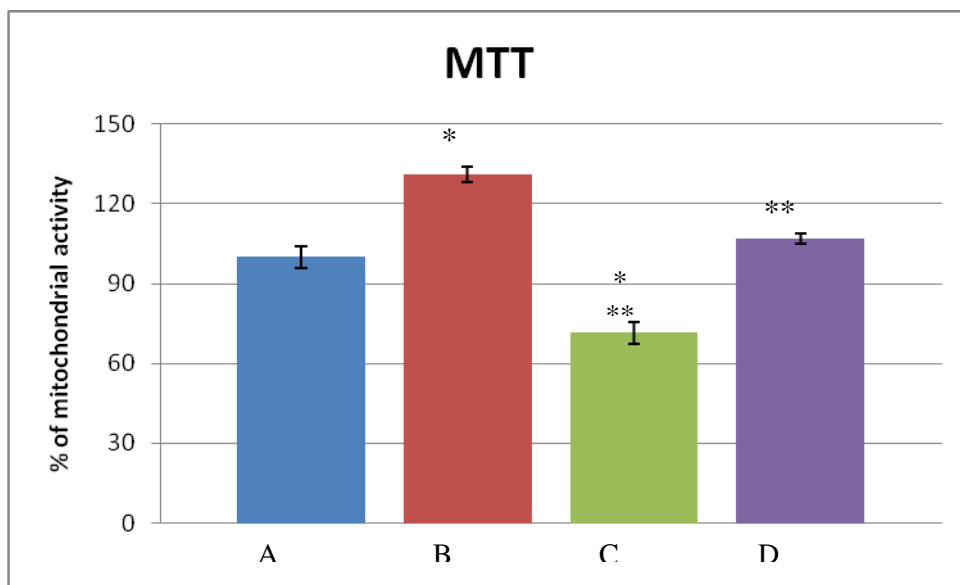


Figura 2 - Dosagem de MTT nas culturas de astrócitos. A - controle, B - tratadas com 1% de mel, C - infectadas com *N. caninum* e D - tratadas com 1% de mel e infectadas com *N. caninum* * $p < 0.01$ e ** $p < 0.05$.

O número de parasitos foi significativamente maior nas culturas infectadas com *N. caninum* (523×10^3 taq/ml), em comparação as culturas tratadas com 1% de mel e infectadas com o *N. caninum* (222×10^3 taq/ml), 72h após a infecção (Figura 3).

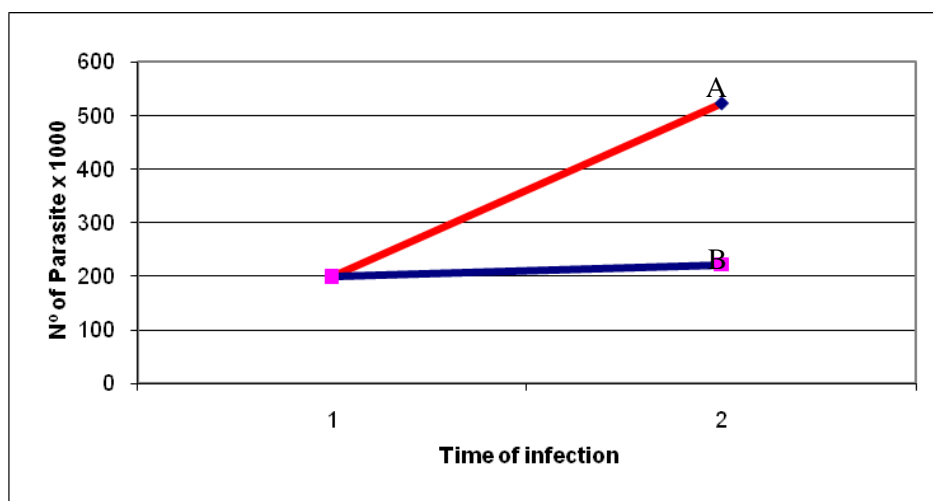


Figura 3 - Total de taquizoítos utilizados na infecção (1) e 72h após a infecção (2), A - culturas infectadas com *N. caninum* ; B - culturas infectadas com *N. caninum* e tratadas com 1% de mel. $p < 0.0001$.

Produção de citocinas – Não houve resultados significativos nas produções de IFN- γ . Para os valores encontrados na produção de TGF- β , observou-se um aumento significativo nas culturas tratadas com 1% de mel, em relação às demais culturas. Entretanto, existe uma redução significativa nas culturas tratadas com 1% de mel e infectadas com *N. caninum* quando comparadas as culturas tratadas com 1% de mel (Figura4).

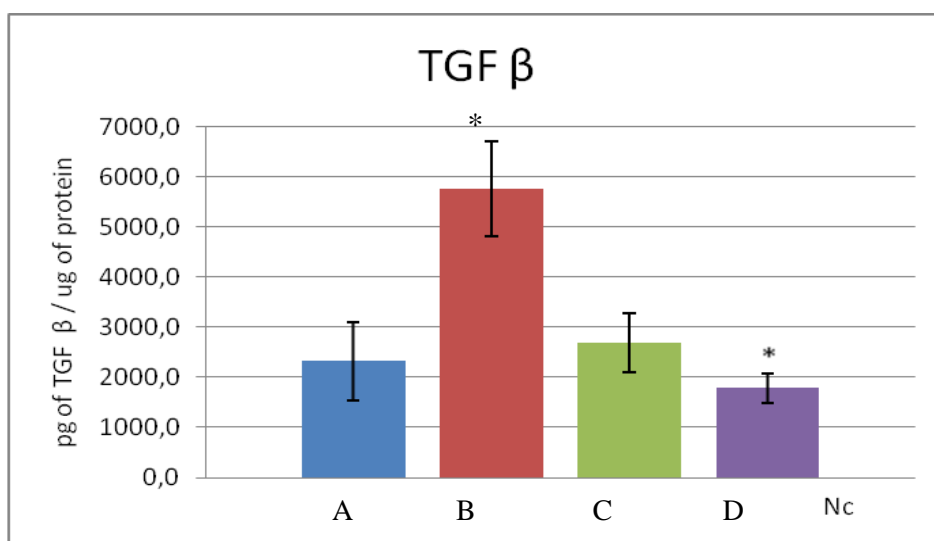


Figura 4 – Produção de TGF- β no sobrenadante das culturas de astrócitos. A- controle, B- meio com 1% do mel, C- meio infectados com *N. caninum* e D- meio tratados com 1% do mel e infectadas com *N. caninum* * $p < 0.05$.

Produção de óxido nítrico - Houve um aumento significativo de NO nas culturas tratadas com 1% de mel quando comparadas com as demais culturas. Entretanto, as células infectadas com o *N. caninum* e tratadas com 1% de mel apresentaram uma redução na produção de NO quando comparadas com aquelas apenas tratadas com 1% de mel (Figura 5).

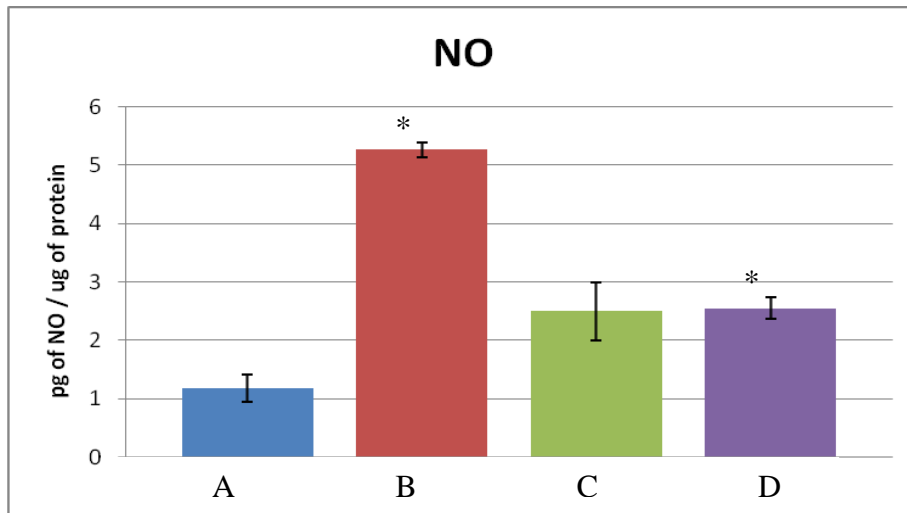


Figura 5 - Produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas de astrócitos. A- controle, B- meio com 1% do mel, C- meio infectados com *N. caninum* e D- meio tratados com 1% do mel e infectadas com *N. caninum* * $p < 0.05$.

Imunocitoquímica - Os astrócitos apresentaram alterações morfológicas nos grupos testados, quando comparados com o grupo controle (Figura 6A). Nas culturas tratadas com 1% de mel os astrócitos apresentaram um aumento no seu corpo celular (Figura 6B). Tanto nas culturas infectadas com o *N. caninum* (Figura 6C), como nas culturas infectadas com o parasito e tratadas com 1 % de mel (Figura 6D), observa-se uma redução do corpo celular e um aumento no número de prolongamentos.

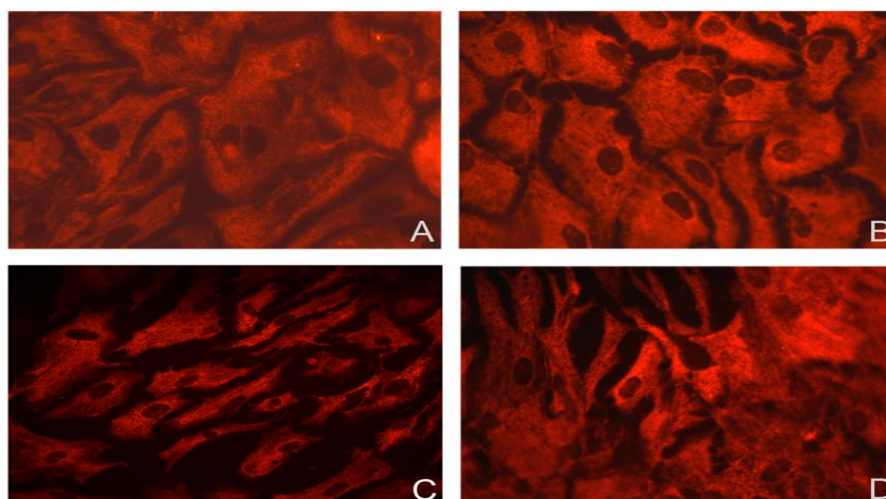


Figura 6 - Morfologia das células astrocitárias A- controle; B- tratadas com o mel; C- infectadas com *N. caninum*; e D- tratadas com 1 % de mel e infectadas com *N. caninum*.

Immunoblotting – Observou-se um aumento na expressão de GFAP do grupo tratado com 1% de mel (Figura 7B) quando comparado com o grupo controle (Figura 7A). Entretanto, houve diminuição da expressão de GFAP entre os tratamentos das células infectadas com *N. caninum* (Figura 7C) quando comparado com o controle. Os grupos infectados com o parasito e tratadas com 1 % de mel (Figura 7D), também apresentaram uma diminuição da expressão de GFAP, porem essa redução foi menor que aquela observada nos grupos que foram tratados apenas com o *N. caninum* (Figura 7C).

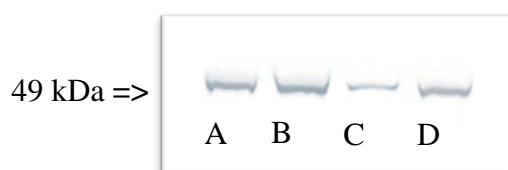


Figura 7 – Immunoblotting do extrato de proteínas extraídas das culturas de astrócitos de ratos, mostrando marcação com GFAP (49kDa). A- controle; B- tratadas com 1% de mel; C- infectadas com *N. caninum*; e D- tratadas com 1 % de mel e infectadas com *N. caninum*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O mel de abelha é uma substância utilizada como medicamento desde o Egito antigo, onde era componente de aproximadamente 500 remédios dos 900 existentes na época (Couto e Couto, 2002). Diante disso, esse trabalho estudou a ação do mel de abelhas sociais sem ferrão *Tetragonisca angustula* em culturas de astrócitos de rato infectados com *Neospora caninum*. Verificou-se que o tratamento das culturas de astrócito de rato com 1% do mel de *T. angustula* levou ao aumento na produção de NO, estabilidade das membranas, produção de TGF β , expressão de GFAP e uma redução na proliferação de taquizoítos de *N. caninum*.

Acredita-se que grande parte dos efeitos descritos na literatura e atribuídos ao mel esteja relacionada aos seus componentes. Na sua composição há uma

mistura complexa de carboidratos, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, vitaminas, sais minerais, pólen e outras substâncias, dentre elas flavonóides (Weston e Brocklebank, 1999; Tonks et. al., 2003; Mendes et al., 2009).

Sabe-se que a composição do mel está relacionada com vários fatores, tais como a fonte de néctar, clima, condições ambientais e também as transformações que podem sofrer durante a sua produção (Azeredo et al., 2003). Diante disso, foram realizadas algumas análise físico químicas com o mel utilizado. Os valores encontrados de umidade, cinzas, condutividade elétrica, pH e acidez são semelhantes ao descrito na literatura para esse tipo de mel de meliponíneos (Cortopassi-Laurino e Gelli, 1991; Villas-boas e Malaspina, 2005; Rodrigues, Marchini e Carvalho, 2005; Souza et al., 2006ab; Anacleto et al., 2009).

Uma vez que, o mel é um composto rico em carboidratos, constituído de diferentes açúcares, predominando os monossacarídeos glicose e frutose (Weston e Brocklebank, 1999; Mendes et al., 2009), isso pode ter influenciado diretamente no aumento da estabilidade das membranas, assim como, no aumento da expressão de GFAP. Isso pode ter acontecido devido a um aumento na disponibilidade energética oriunda desses carboidratos. Os resultados encontrados no teste de MTT demonstram que as células tratadas com 1% de mel apresentaram um aumento no metabolismo mitocondrial quando comparadas com as demais culturas.

Cooper, Molan e Harding (2002), ao avaliarem o efeito do mel *in vitro* como agente antibacteriano, observaram a sensibilidade de microorganismos de importância clínica a este agente. Segundo os autores, o efeito inibitório do crescimento bacteriano não se dá exclusivamente pelo efeito osmótico exercido pelo mel, mas sim por outros fatores ainda não detectados. O mecanismo de ação do mel ainda não foi completamente elucidado, mas os componentes da osmolaridade, acidez, formação de peróxidos de hidrogênio e seus fotoquímicos são considerados fatores de importância (Molan, 1992a). Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) consideraram que a ação antimicrobiana do mel foi oriunda do pH ácido, acúmulo de íons e secreções glandulares das abelhas além da presença dos flavonóides.

Esses fatores podem estar relacionados com a diminuição do número de parasitos encontrados nas culturas tratadas com 1% de mel 72h após a infecção.

Entretanto, o mel de abelha também é responsável pela liberação de NO e TGF β , como observado no estudo, que podem estar diretamente relacionados com o controle da proliferação dos taquizoítos de *N. caninum*, uma vez que intermediários reativos como H₂O₂ e NO, são capazes de destruir protozoários intracelulares, controlando, assim, a proliferação parasitária (Denkers *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Coelho-Castelo *et al.*, 2009).

Sabe-se, que os flavonóides atuam modulando células envolvidas com a inflamação, inibindo a produção de linfócitos T e citocinas pró-inflamatórias, modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de NO (Coutinho, Muzitano e Costa, 2009; Tuñon *et al.*, 2009). Segundo Tonks *et al.*(2003) os flavonóides existentes no mel de abelha, são responsáveis por promover um efeito modulador na inflamação.

Existem alguns relatos na literatura que comprovam o aumento da produção de NO após a administração do mel. O mel das abelhas da subfamília Meliponinae aumenta a concentração de NO na saliva de humanos e sua administração intravenosa e intrapulmonar promove melhoria das funções renal e hepática, além de estimular a atividade da medula óssea e do perfil lipídico (Al Waili e Boni, 2003; Al-Waili, 2004b).

O TGF- β é responsável por regular a sinalização e diferenciação celular, além de controlar diversos processos celulares incluindo proliferação, diferenciação, migração, apoptose, produção de matriz extracelular e modulação da função imune (Vilar, Jansen e Sander, 2006; Wang *et al.*, 2008). Essas funções do TGF β talvez possam explicar a maior expressão de GFAP daquelas células que foram tratadas com o mel.

Tanto o mel, como outros produtos das abelhas, a exemplo do própolis, estimulam a produção de citocinas inflamatórias (Oka *et al.*, 2001) regulando o crescimento de linfócitos, suprimindo as citocinas pró-inflamatórias e induzindo os linfócitos T reguladores derivados TGF- β (Sakaguchi, 2000). Esse efeito estimulatório na produção do TGF- β foi relatado por Ansorge, Reinhold e Lendeckel (2003), ao utilizarem o própolis em culturas de células e de linfócitos T humanas.

Diante desses resultados, sugere-se que o mel de *Tetragonisca angustula* conferiu proteção as culturas de astrócitos de rato infectadas com taquizoítos de

N. caninum. Entretanto, estudos são necessários para melhor compreender quais os mecanismos envolvidos nessa proteção, especialmente no que diz respeito ao controle da multiplicação parasitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. 2004 Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chem.**, v. 85, p. 513-518.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. 2002 Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutr. Res.**, v. 22, p. 1041-1047.

ALVAREZ-MAUBECIN, V.; GARCIA-HERNANDEZ, F.; WILLIAMS, J. T.; VAN BOCKSTAELE, E. J.; 2000 Functional coupling between neurons and glia. **J Neurosci**, 20, 4091-4098p.

AL-WAILI N, BONI N.; 2003 Natural honey lowers plasma prostaglandins concentrations in normal individuals. **J Med Food**, 6, 129–133p.

AL-WAILI N.; 2003 Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood minerals and enzymes levels in normal individuals. **J Med Food**, 6. 135–142p.

AL-WAILI, N. S.; 2004b Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. **Journal of Medicinal Food**, 7, 491–294p.

ANACLETO, D. A.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; 2009 Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* latreille, 1811). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 29, n 3, 535-541p.

ANSORGE S, REINHOLD D, LENDECKEL U. 2003 Propolis and some of its constituents downregulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGFbeta1 production of human immune cells. **Z Naturforsch**; 58c, 580-589p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - A.O.A.C. 1998 **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington.

ATAGO Co. 1988 Refratômetro para mel. **Abelhas**, v. 31, n. 362/363, p. 9, 11-12, 41-44p.

BAUMANN, N.; PHAM-DINH, D.; 2001 Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. **Physiol. Rev.** 81, 871-927p.

BARRES, B. A.; BARDE, Y. A.; 2000 Neuronal and glial cell biology. **Current Opinion in Neurobiology**, 10, 642-648p.

BIJLSMA, L.; BRUIJN, L.L.M.; MARTENS, E.P.; SOMMEIJER, M.J. 2006 Water content of stingless bee honey (Apidae, Meliponini): Interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**. 37: 480 – 486p.

BOBANY, D. M.; PIMENTEL, M. A. P.; MARTINS, R. R. C.; NETTO, B. E. de S.; TOLLA, M. S. de; 2010 Atividade antimicrobiana do mel de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) em cultivo de microrganismos do conduto auditivo de caninos domésticos (*Canis familiaris*) Ci. Anim. Bras., Goiânia, 11, n 2, 441-446p.

BOLETIN OFICIAL ESPAÑOL (BOE). 1986 Orden de 12 de junio de 1986, de la Presidencia del Gobierno por la que se a prueban los métodos oficiales de análisis para la miel. Madrid. N.145

BREYER, E.U. 1983 **Abelhas e saúde**. 3. Ed. Santa Catarina: Uniporto, 80p.

CARMICHAEL, J., DE GRAFF, W.G., GAZDAR, A.F., MINNA, J.D., MITCHELL, J.B. 1987 Evaluation of a Tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res.**, 47, 936p.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F.; 2002 Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**; 73: 1-6p.

COELHO-CASTELO, A.A.M.; TROMBONE, A.P.F.; ROCHA, C.D.; LORENZI, J.C.C.; 2009 Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, 42, n-2, 127-142p.

COOPER, R.;A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G.; 2002. The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. **J Appl Microbiol** 93, 857-863p.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. 1991 Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. **Apidologie**, v. 22, p. 61-73.

CORTOPASSI -LAURINO, M. E.; GELI, D. S. 1984 Propriedades antibacterianas de méis brasileiros. **Ciência e Cultura**, v. 36, n. 7, p. 616.

COSTA, S., PLANCHENAU, T., CHARRIERE-BERTRAND, C., MOUCHEL, Y., FAGES, C., JULIANO, S., LEFRANCOIS, T., BARLOVATZ-MEIMON, G., TARDY, M., 2002. Astroglial permissivity for neuritic outgrowth in neuron–astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability. **Glia** 37, 105–113.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; 2009 Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.**, 1, 3, 241-256p.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. 2002 **Apicultura**: Manejo e produtos. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 191 p.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A.; DEL RIO, L.; BENNOUNA, S.; 2004 Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. **International Journal for Parasitology**, 34, 411-421p.

DIENEL, G. A.; CRUZ, N. F.; 2006 Astrocyte activation in working brain: energy supplied by minor substrates. **Neurochem. Int.** 48, 586–595p.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. 2007 Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical and Microbiological Reviews** 20: 323-367.

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

FUKUDA, M., KOBAYASHI, K., HIRONO, Y., MIYAGAWA, M., ISHIDA, T., EJIOGU, E.C., SAWAI M., PINKERTON, K.E., TAKEUCHI, M. 2009 Jungle Honey Enhances Immune Function and Antitumor Activity. **eCAM Advance**, p, 1-8.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. 2005 Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivo Instituto Biológico**, 72, n 4, 455-459p.

GONDIM, L. F. P. 2006 *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology** 22: 247-252.

GONDIM, L.F., PINHEIRO, A.M., SANTOS, P.O., JESUS, E.E., RIBEIRO, M. B., FERNANDES, H.S., ALMEIDA, M.A., FREIRE, S.M., MEYER, R., MCALLISTER, M.M. 2001 Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, 101, 1-7.

HAN, S.; LEE, K. G.; YEO, J. H.; KWEONA, H. Y.; WOO, S. O.; LEE, M. L.; BAEK, H. J.; KIM, S. Y.; PARK, K. K.; 2007 Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor- α production stimulated by LPS. **Journal of Ethnopharmacology**. 111, 176–181p.

KOHNO, K.; OKAMOTO, I.; SANO, O.; ARAI, N.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M.; 2004 Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 68, n 1, 138-145p.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G.; 2005 Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, 2, n 4. Disponível em: <http://www.aspta.org.br/publique/media/artigo1v2n4.pdf>. Acesso em: 24 Maio 2010.

LOWRY, O.H.; ROSENTHAL, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p.265-75.

MAJTÁN, J., KOVACOVA, E., BILIKOVA, K., SIMUTH, J. 2006 The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNF α release. **Int. Immunopharmacol.** 6, 269–278p.

MALAVAZZI, G. R.; LAKE, J. C.; DANTAS, P. E. C.; 2005 Efeito do mel e do soro autólogo na cicatrização do epitélio corneano em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, 68, n. 3. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abo/v68n3/24737.pdf>
Acesso em: 25 Maio 2010.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; MESQUITA, L. X.; MARACAJÁ, P.B.; 2009 As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, Caatinga (Mossoró,Brasil), v.22, n.2, p.07-14.

MIORIN, P. L.; LEVI JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BREZ, W. A.; MARCUCCI, M. C.; 2003 Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p 913-920.

MOLAN, P. C. 2001 Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. **Bee World**, . 82, n. 1, p. 22-40.

MOLAN, P.C.; 1992b The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. **Bee World** 73, 59–76p.

MOLAN, P.C.; 1999 The role of honey in the management of wounds. **Journal of Wound Care** 8, 415–418p.

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

OKA, H.; EMORI, Y.; KOBAYASHI, N.; HAYASHI, Y.; NOMOTO, K.; 2001 Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. **International Immunopharmacology**, 1, 521-532p.

PEKNY M, NILSSON M., 2005, Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia.** 50, 427- 434p.

PINHEIRO, A.M.; COSTA, S.L.; FREIRE, S.M.; ALMEIDA, M.A.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M.F.D. 2006a Astroglial cells in primary culture: a valid model to study *Neospora caninum* infection in the CNS. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v. 15, n.113, p.243-247.

PRAKASH, A., MEDHI, B., AVTI, P. K., SAIKIA U. N., PANDHI P. E KHANDUJA K. L. 2008 Effect of Different Doses of Manuka Honey in Experimentally Induced Inflammatory Bowel Disease in Rats. **Phytotherapy research** *Phytother. Res.* 22, 1511–1519.

ROBERFROID, D. M. B. 2000 Prebiotics and probiotics: are they foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, supl., p. 1682-1687

RODRIGUES, A. C. L.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. 2005 Análises de mel de *Apis mellifera* L. 1758 e *Tetragonisga angustula* (Latreille, 1811) coletado em Piracicaba-SP. **Revista da Agricultura**, v. 73, n. 3, p. 255-262.

SAKAGUCHI S.; 2000 Regulatory T cells: Key control- lers of immunologic self-tolerance. **Cell**. **101**, 455-458p.

SHAN, N. P. 2001 Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technol.**, v. 55, n. 11, p. 46-56.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. 2004 Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 8, n. 2/3, p. 260-265p.

SILVA, R.A.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; COSTA, J.M.C. 2006 Composition and therapeutic properties of bee honey. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.17, n.2, 113-120p.

SNOW, M. J.; MANLEY-HARRIS, M. 2004 On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. **Food Chem.**, v. 84, n. 11, p. 145-147

SOUZA, B. de A.; MARCHINI, L.C.; ALVES, R.M.; CARVALHO, A.L. de; SODRÉ, G.da S. 2006b Caracterização físico-química de amostras de méis de *Tetragonisca angustula*, provenientes das regiões do litoral norte e metropolitana do Estado da Bahia. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA**, 16, 2006. **Anais...** Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura.

SOUZA, B. de A.; ROUBIK, D.; BARTH, O.; MARCHINI, L.C.; CARVALHO, A.L. de; SODRÉ, G.da S. 2006a Composición de la miel de abejas sin aguijón: Estableciendo requisitos de calidad. **Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 867-875.

TARDY, M., 1991. Astrocyte et homéostasie. *Médecine/Sciences* 7, 799–804.

TONKS, A. J., DUDLEY, E., PORTER, N. G., PARTON, J., BRAZIER, J., SMITH, E. L., AND TONKS, A., A. 2007 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. **Journal of Leukocyte Biology**. Volume 82, November

TONKS, A.J., COOPER, R.A., JONES, K.P., BLAIR, S., PARTON, J., TONKS A. 2003 Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. **Cytokine** 21, 242–247.

TUÑÓN, M. J.; GARCIA-MEDIAVILLA, M. V.; SANCHEZ-CAMPOS, V.; GONZALEA-GALLEGO, J.; 2009 Potential of flavanoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. **Bentham Science**, 10, n 3 , 256-271p.

VILAR, J.M.; JANSEN, R.; SANDER, C. 2006 Signal processing in the TGF-beta superfamily ligand-receptor network. **PLoS Comput. Biol.** 2, e3. 10.1371/journal.pcbi.0020003.

VILLAS-BOAS, J. K.; MALASPINA, O. 2005 Parâmetros físico-químicos propostos para controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**, n. 82, p. 6-16.

WANG, S. E.; HINOWB, P.; BRYCEA, N.; ESTRADA, A.M. W. L.; ARTEAGA C.L.; WEBB, G. F.; 2008 A mathematical model quantifies proliferation and motility effects of TGF- β on cancer cells. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**. 200, 1-13p.

WESTON, R. J., BROCKLEBANK, L. K., 1999 The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. **Food Chem**. 64, 33–37.

WON, J. G.; YOON, S. C.; KIM, S. W.; JEFFERSON, A.; DUTTON, E. G.; HOLBEN, B.; 2004 Estimation of direct radiative forcing of Asian dust aerosols with sun/sky radiometer and lidar measurements at Gosan, Korea, **J. Meteorol. Soc. Jpn.**, 82, 115-130p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mel estimulou o aumento do metabolismo mitocondrial e da estabilidade de membrana das células astrócitárias. Promoveu a liberação de citocinas e de composto reativos de nitrogênio.

Culturas tratadas com mel apresentaram aumento do corpo celular e aumento na expressão da proteína do gliofilamento, presente nas células astrócitárias.

O numero de taquizoítos de *Neospora caninum* nas culturas tratadas com mel, mantiveram-se próximo do número utilizado no momento da infecção.

O mel de *Tetragonisca angustula* confere proteção as culturas de astrócitos de rato infectadas com taquizoítos de *N. Caninum*.

Entretanto, estudos são necessários para melhor compreender quais os mecanismos envolvidos nessa proteção, especialmente no que diz respeito ao controle da multiplicação parasitária.