

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

**ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE CELULAR EM CULTURAS
MISTAS DE RATOS INFECTADAS *IN VITRO* COM *Neospora
caninum* E TRATADAS COM MEL DE JATAÍ (*Tetragonisca
angustula*)**

ÂNGELA CRISTINA DE OLIVEIRA LIMA

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
AGOSTO – 2012**

**ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE CELULAR EM CULTURAS
MISTAS DE RATOS INFECTADAS *IN VITRO* COM *Neospora
caninum* E TRATADAS COM MEL DE JATAÍ (*Tetragonisca
angustula*)**

ÂNGELA CRISTINA DE OLIVEIRA LIMA

Médica Veterinária

Universidade Federal da Bahia, 1990

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 Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Jair de Araújo Marques (*in memoriam*)

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA

AGOSTO– 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

L732 Lima, Ângela Cristina de Oliveira
Estudos de Citotoxicidade Celular em culturas mistas de ratos infectadas *in vitro* com *Neospora caninum* e tratadas com mel de Jataí (*Tetragonisca angustula*) / Ângela Cristina de Oliveira Lima. – Cruz das Almas, BA, 2012.
80f.: il. ; 28 cm

Orientador: Dr. Alexandre Moraes Pinheiro.
Coorientador: Dr. Jair de Araújo Marques

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Parasitologia Veterinária – *Neospora Caninum*. 2. Doenças Parasitárias – Neosporose 3. Medicina Veterinária - Doença Neurológica. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 636.089696

**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
ÂNGELA CRISTINA DE OLIVEIRA LIMA**

Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)

Profª Drª. Cátia Suse O. Ribeiro
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Fred da Silva Julião
Instituto Federal Baiano

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Belinha, que me proporcionou as condições para que eu me tornasse a profissional que sou.

Ao meu pai Arylton de Carvalho Lima (*in memoriam*), minha mais forte influência para a escolha da minha profissão de Médica Veterinária.

Ao meu esposo Valter, que me apoiou, compreendendo minhas ausências durante esta jornada.

Aos meus irmãos, Aryane, Teresa e João.

À minha querida irmã Eleni.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pai soberano e único, por me dar força e saúde para concluir este trabalho.

Ao meu orientador e amigo Alexandre pela paciência, dedicação, confiança e ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador Prof. Jair Marques (*in memoriam*), pelos ensinamentos e carinho transmitidos em todas às vezes à qual necessitei da sua orientação.

Aos colegas da UFRB: Linsmar, Rodrigo, Maria Carolina e Vitória pelo apoio e incentivo.

Aos colegas do NUATE pelo constante apoio com palavras de alento e carinho.

À Rosenir pela compreensão.

Aos professores da UFRB: Adriana, Ana Karina, Evani, Meybe e Veridiana, pelo auxílio e apoio nas diversas fases desse trabalho.

Em especial ao professor Carlos Lêdo, pela grandiosa ajuda na realização da estatística desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia da UFBA: Dra. Cátia Suse, Alex, Greg e Bruno, pela ajuda na realização de algumas análises.

A direção e funcionários da LABOVET pelo apoio e ajuda com equipamentos e insumos.

Aos amigos do Biotério da UEFS pela doação dos animais.

Ao INSECTA, na pessoa do Prof. Carlos Alfredo e do Roberto, pelo fornecimento do mel para o experimento.

Às minhas grandes parceiras e amigas que me incentivaram neste trabalho: Cláudia Valle e Lilian Porto.

Às grandes amigas que conquistei ao longo da minha vida profissional Deborah, Kenya e Wilma.

Aos meus companheiros de laboratório Carol, Cintia, Philipe e Luciana.

Aos meus colegas de mestrado em especial Calena, Rone e Marcílio.

Aos amigos e companheiros de viagem: Diego, Tatiana e Suzana.

Meus irmãos, parceiros frequentes.

Minha adorada cunhada Rose Mere.

Meus sobrinhos queridos.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para a concretização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> em cultivo de células VERO	6
Figura 2 - Cistos de <i>Neospora caninum</i> em cortes de cérebro de Gerbil. A – Coloração: hematoxilina e eosina. B – Imuno-histoquímica	7
Figura 3 - Oocisto de <i>Neospora caninum</i> . A – Oocisto não esporulado. B – Oocisto esporulado	8
Figura 4 - Ciclo de vida silvestre e doméstico de <i>Neospora caninum</i> (Adaptado de Teixeira, 2008)	9
Figura 5 - Células da Glia do SNC: Astrócito, oligodendrócito, microglia e células ependimárias	16
Figura 6 - Astrócitos fibrilares em cicatriz glial. A – Hematoxilina fosfotúngstica, B – Imunofluorescência.....	18
Figura 7 - Mudanças morfológicas durante a ativação microglial. (Adaptado de Vilhardt, 2005)	20
Figura 8 - Colméia de <i>T. angustula</i>	24

ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE CELULAR EM CULTURAS MISTAS DE RATOS INFECTADAS *IN VITRO* COM *Neospora caninum* E TRATADAS COM MEL DE JATAÍ (*Tetragonisca angustula*)

Autor: Ângela Cristina de Oliveira Lima

Orientador: Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

RESUMO: *Neospora caninum* é um parasito intracelular causador da neosporose, enfermidade que acomete várias espécies animais causando abortos e distúrbios neurológicos. Estudos recentes envolvendo o *N. caninum* demonstraram que as células gliais têm sido consideradas um modelo de infecção *in vitro* válido para este protozoário. As células da glia desempenham um importante papel na defesa do Sistema Nervoso Central. O mel tem sido utilizado desde a antiguidade pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas. O presente estudo objetivou avaliar, *in vitro*, a reatividade de células gliais (astrócitos e microglias) infectadas com *N. caninum* tratadas com 1% de mel de Jataí (*Tetragonisca angustula*). Culturas primárias mistas de astrócitos e microglias de ratos (*Rattus norvegicus*) foram tratadas com 1% de mel de Jataí (*Tetragonisca angustula*) a partir do 8º dia de cultivo. No 15º dia de cultivo as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum*, cepa NC-Bahia. Após 72h de infecção foram realizados testes a fim de verificar o metabolismo mitocondrial, a atividade da lactato desidrogenase (LDH), a produção de óxido nítrico (NO) e o número total de parasitos. Nas culturas tratadas com 1% de mel foram observadas elevações no metabolismo mitocondrial e na permeabilidade celular. Ocorreu aumento na produção de nitritos, possivelmente indicando ativação microglial. Os valores de NO encontrado nesse estudo podem representar o início de uma resposta imune contra os taquizoítos de *N. caninum*, uma vez que esse acréscimo pode contribuir para redução do número de taquizoítos. Desta forma sugere-se que o mel exerceu um efeito protetor sobre as culturas de astrócitos e microglias infectadas com *N. caninum*.

Palavras-chave: astrócitos, microglias, *Neospora*, óxido nítrico, mel.

CELL CYTOTOXICITY IN RATS MIXED CULTURES INFECTED *IN VITRO* WITH *Neospora caninum* AND TREATED WITH JATAÍ (*Tetragonisca angustula*) HONEY

Author: Ângela Cristina de Oliveira Lima

Advisor: Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

ABSTRACT: *Neospora caninum* is an intracellular parasite that causes neosporosis. This disease affects many species, causing abortions and neurologic disorders. Recently studies involving *N. caninum* demonstrated that glial cells have been considered a valid model of *in vitro* infection for this protozoan. Glial cells play important role in the protection of the central nervous system. Once honey has been used since ancient times to control infections and inflammatory reactions, the aim of this study was to evaluate the effects of 1% Jataí (*Tetragonisca angustula*) honey treatment in glial cells, infected *in vitro* with *N. caninum*. Astrocytes and microglia mixed cultures were treated with 1% of honey after eighth day in cell culture. On the day 15 cultures were infected with tachyzoites of *N. caninum*. After 72 hours of infection, mitochondrial metabolism, lactate dehydrogenase activity (LDH), production of nitric oxide (NO) and total number of parasites were studied in cultures. Treatment with 1% honey had an increase of mitochondrial metabolism, cell permeability, and in the levels of nitric oxide. Cultures with an increase in the nitrite production can indicate microglial activation. The NO values found in this study, could represent a beginning of an immune response against the tachyzoites of *N. caninum*, since this could reduce the number of tachyzoites. Thus it is suggested that honey exerted a protective effect on the cultures of astrocytes and microglia infected with *N. caninum*.

Key-words: astrocytes, microglia, neosporosis, nitric oxide, honey.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
SUMÁRIO.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1.1. Histórico e Classificação do <i>Neospora caninum</i>	3
1.2. Biologia do <i>Neospora caninum</i>	4
1.2.1. Formas evolutivas.....	5
1.2.2. Ciclo de vida de <i>N. caninum</i>	8
1.3. Formas de Transmissão.....	11
1.4. Resposta Imune.....	12
2. SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	15
2.1. Astrócitos.....	17
2.2. Microglias.....	19
2.3. Mediadores químicos.....	21
3. MEL.....	22
3.1. Histórico do mel.....	22
3.2. Utilização do mel.....	24
3.3. Propriedades do mel.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
4. Capítulo 1	

PRODUÇÃO DE NO EM CULTURAS MISTAS DE RATOS INFECTADAS *IN VITRO* COM *Neospora caninum* E TRATADAS COM MEL DE JATAÍ (*Tetragonisca angustula*).....52

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....67

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório que causa a neosporose, uma das principais causas de abortamento e mortalidade neonatal na pecuária bovina (Dubey, 2003; Bielsa, 2004). Na última década despontou como principal doença reprodutiva de bovinos do mundo inteiro e atualmente é considerada como uma importante causa de perda fetal em rebanhos leiteiros e de corte, sendo o aborto associado ao maior impacto econômico da pecuária (Trees *et al.*, 1999; Anderson, Andrianarivo e Conrad, 2000; Dubey, 2003).

São relatadas duas formas de transmissão da neosporose bovina. A transmissão vertical que é a forma mais comum a qual ocorre como consequência do nascimento de animais infectados congenitamente, e a horizontal onde os bovinos se infectam pela ingestão de oocistos disseminados nas fezes de cães, que contaminam os alimentos e água (Schares *et al.*, 1998). Os cães (McALLISTER *et al.*, 1998), os coiotes (Gondim *et al.*, 2004) e os dingos (King *et al.*, 2010), são os hospedeiros definitivos comprovados de *N. caninum*.

O conhecimento dos aspectos imunológicos desta enfermidade é importante para o estabelecimento de estratégias de controle (Anderson, Andrianarivo e Conrad, 2000). Por ser um *N. caninum* um parasito intracelular obrigatório (Hemphill, 1999), a resposta imunológica mediada por células é fundamental para a imunidade do hospedeiro.

O sistema nervoso central (SNC) é uma estrutura complexa e heterogênea com dois tipos celulares, divididos em neurônios e células gliais. As células gliais dividem-se em macroglia (oligodendrócitos e astrócitos); microglia e células endimárias. Os astrócitos e a microglia são as duas principais populações de células reativas a danos neuronais e as alterações no microambiente cerebral (Streit, Walter e Pennell, 1999).

Devido à necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos, diversas pesquisas têm sido realizadas utilizando produtos naturais, seja de origem vegetal ou animal, visando à detecção e caracterização de compostos químicos com propriedades terapêuticas (Gonçalves, Alves Filho e Menezes, 2005). O mel de abelha é considerado uma fonte natural de saúde devido às suas qualidades medicinais (Silva, Queiroz e Figueiredo, 2004).

O mel tem sido mencionado por suas variedades de propósitos medicinais e nutricionais (Molan, 2001) tais como: atividade antimicrobiana (Snow e Manley-Harris, 2004), protetor da mucosa gastrointestinal (Prakash *et al.*, 2008), antioxidante (Al-Mamary, Al-Meerri e Al-Habori, 2002; Aljadi e Kamaruddin, 2004), prebiótica (Roberfroid, 2000; Shan, 2001.), além de antiinflamatória (Tonks *et al.*, 2003; Tonks *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2009), agindo na resposta imunológica.

As células da glia desempenham um importante papel na defesa do SNC e as culturas de astrócitos/microglias têm sido utilizadas como modelo para avaliar a citotoxicidade dessas células com o *N. caninum*. Em estudo recente com astrócitos observou-se que o mel induziu a ativação dessas células e a produção de citocinas e de compostos reativos de nitrogênio (Gonçalves, 2011). Diante disso, este estudo foi desenvolvido visando avaliar os efeitos tóxicos produzidos em culturas mistas de astrócitos/microglias, infectadas *in vitro* com *N. caninum* e tratadas com mel de Jataí (*Tetragonisca angustula*).

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Histórico e Classificação do *Neospora caninum*

Bjerkas, Mohn e Presthus, em 1984, observaram um parasito muito semelhante ao *Toxoplasma gondii*, associado às lesões inflamatórias e necrose no sistema nervoso central (SNC) e músculo esquelético de seis filhotes de uma cadela da raça Boxer. Os animais não apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* segundo o teste Sabin Feldman, mas evidenciavam paralisia dos membros posteriores, sinal que não é comum em animais com toxoplasmose. Além disso, apresentavam cistos morfologicamente distintos de *T. gondii*, localizados restritamente no SNC.

Caso semelhante ao descrito anteriormente foi relatado por Hilali *et al.* (1986) em um cão Greyhound, de três meses de idade, com sinais de movimentos irregulares e atrofia muscular dos membros posteriores. Na avaliação histopatológica e ultraestrutural foram encontrados cistos semelhantes aos de *T. gondii*, no entanto a reação de imuno-histoquímica foi negativa para esse protozoário. A partir dessas observações foi sugerido que se tratava de um novo coccídeo.

Já em 1987, um caso de encefalomielite foi descrito em um bezerro por O'Toole e Jeffrey, tendo o animal apresentado sinais neurológico logo após o nascimento e morrendo aos cinco dias de vida. Parasitos diferentes ultraestruturalmente do *T. gondii* foram encontrados associados às lesões, reagindo fracamente com anticorpos anti-*Sarcocystis* e negativamente para anticorpos anti-*Toxoplasma* na imuno-histoquímica.

Parish *et al.* (1987) descreveram outro caso de encefalomielite associada à presença de cistos do protozoário no tecido cerebral de quatro bezerros. Uma avaliação sorológica foi realizada em apenas dois dos bezerros e em suas

respectivas mães, no entanto, os animais testados não apresentaram anticorpos anti-*Toxoplasma* ou *Sarcocystis*. A identificação do parasito não foi realizada, pois as formas encontradas não foram avaliadas ultra estruturalmente.

Dubey *et al.* (1988a), reavaliaram tecidos conservados de cães com diagnóstico de toxoplasmose, sendo que em 10 de 23 casos, foram observados estágios de um parasito distinto estruturalmente e não reativos a anticorpos anti-*T. gondii* no teste imuno-histoquímico. Após esse estudo, esses autores denominaram o novo parasito de *Neospora caninum*, uma nova espécie do filo Apicomplexa. No mesmo ano de sua classificação, o *N. caninum* foi isolado pela primeira vez em cultivo celular a partir de tecidos de cinco cães que apresentaram paresia dos membros posteriores (Dubey *et al.*, 1988b), possibilitando a elaboração de um ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*.

Os cistos de tecidos de *N. caninum* descritos por Bjerkas, Mohn e Presthus, em 1984 e por Bjerkas e Presthus, em 1989 e observados por Dubey *et al.* (1988a) e Dubey *et al.* (1990) demonstraram ser morfológica, biológica, molecular e imunologicamente sem distinção do parasito encontrado nas fezes de cães infectados naturalmente (Basso *et al.*, 2001) e do parasito dos tecidos de bovinos (Barr *et al.*, 1993; Conrad *et al.*, 1993; Dubey e Lindsay, 1996; Holmdahl *et al.*, 1997).

Lindsay, Ritter e Brake, 2001a, induziram a produção de oocistos de *N. caninum* nas fezes de cães, alimentados com tecidos contendo cisto deste parasito. Em 2002, Muller *et al.*, e Schares *et al.*, detectaram por reação de polimerase em cadeia (PCR) o *N. caninum* em tecidos de animais que desenvolveram anticorpos anti-*N. caninum* após terem sido inoculados artificialmente. Ainda em 2002, Dubey *et al.*, encontraram taquizoítos e cistos de *N. caninum*, no interior de células de hospedeiros intermediários.

1.2. Biologia do *Neospora caninum*

O gênero *Neospora* pertence ao sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae (Dubey *et al.*, 1988a; Dubey *et al.*, 1990; Dubey *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002; Schares *et al.*, 2002). Neste gênero duas espécies são conhecidas, *N. caninum* (Dubey *et al.*, 1988a),

isolado de cérebro de cão e *N. hughesi* (Dubey *et al.*, 2001), isolado do cérebro e medula espinhal de eqüinos.

N. caninum tem sido encontrado em ampla variedade de tecidos, a exemplo de: cérebro, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins, membranas fetais, placenta, músculos e pele (Dubey e Lindsay, 1996; Peters *et al.*, 2001a). Este protozoário possui algumas formas para garantir sua perpetuação. Primeiro por possuir habilidade para infectar o maior número de células possíveis; segundo, *N. caninum* explora sua capacidade de responder às alterações, convertendo-se em cistos ou na sua forma infectante novamente; e, por último, desenvolve mecanismos moduladores de acordo com o necessário para sua sobrevivência (Hemphill e Gottstein, 2006). Além do demonstrado por Dubey *et al.* (1990), de que a resistência interior dos cistos à exposição de solução de ácido clorídrico – pepsina confirma a transmissão de um animal para outro através da ingestão de tecidos contendo esses cistos viáveis.

1.2.1 Formas evolutivas

N. caninum possui um ciclo de vida com três formas infectantes: os taquizoítos, os cistos contendo bradizoítos e os oocistos com os esporozoítos. Os taquizoítos são considerados os organismos proliferativos, pois se multiplicam rapidamente causando morte celular e disseminação da infecção (Buxton, McAllister e Dubey, 2002). Os bradizoítos são os organismos de multiplicação lenta ou de latência e estão em grande número dentro de cistos teciduais (Dubey e Lindsay, 1996). Os oocistos foram a última forma identificada de *N. caninum*, após serem observados nas fezes de cães que ingeriram cérebros de camundongo com cistos de *N. caninum* (McAllister *et al.*, 1998), nas fezes de coiotes que ingeriram tecidos de bezerros infectados com o protozoário (Gondim *et al.*, 2004) e no trato intestinal de dingos (*Canis lupus dingo*) alimentados com tecidos de bezerros infectados com *N. caninum*. Os oocistos são eliminados nas fezes, na forma não esporulada, do hospedeiro definitivo. Quando estes oocistos esporulados são ingeridos por um hospedeiro intermediário, os esporozoítos infectantes são liberados no trato intestinal, penetram nas células e se transformam em taquizoítos, que se dividem rapidamente, lesando as células e disseminando a infecção (Lindsay, Dubey e Duncan, 1999a).

Os taquizoítos (Figura 1) apresentam forma ovóide, globular ou lunar e medem aproximadamente 3-7 por 1-5 μm , a depender do estágio de divisão (Dubey *et al.*, 2002; Dubey, 2003). Por ser um parasito intracelular, o mesmo é capaz de invadir células nucleadas, o que pode ocorrer dentro de cinco minutos de contato do taquizoíto com a célula (Hemphill, Gottstein e Kaufmann, 1996).

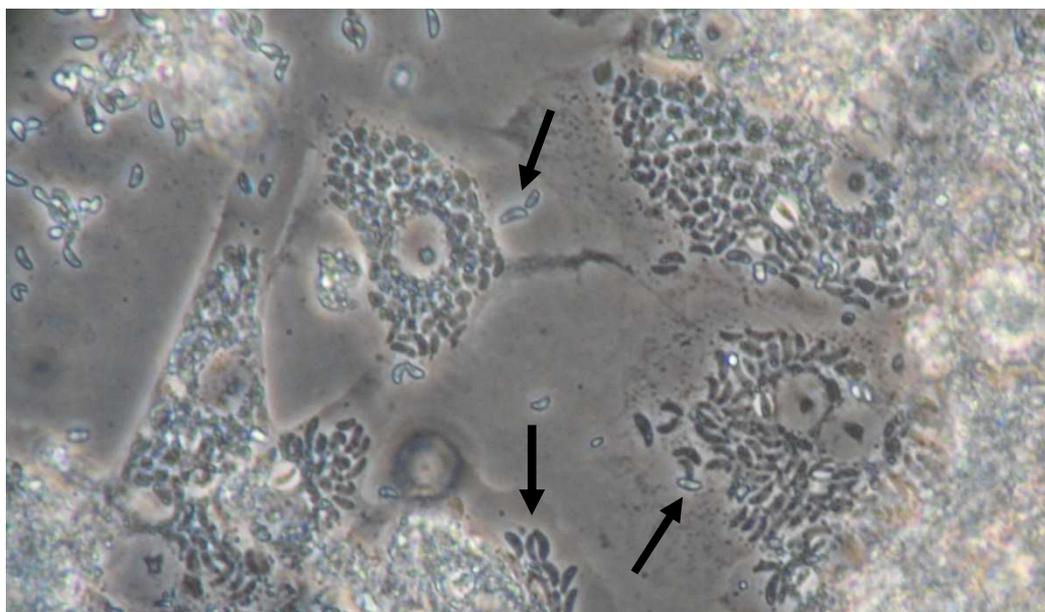


Figura 1. Taquizoítos de *Neospora caninum* em cultivo de células VERO. Aumento de 400X. Foto: Acervo pessoal.

No interior da célula, os taquizoítos localizam-se dentro de um vacúolo parasitóforo no citoplasma e proliferam-se por endodiogenia, produzindo um grande número de novos parasitos em poucos dias (Dubey e Lindsay, 1996; Hemphill, 1999). A rápida multiplicação dos taquizoítos ocorre na fase aguda da infecção, e a sua diferenciação entre taquizoítos e bradizoítos é essencial no estabelecimento da infecção crônica e na exacerbação da mesma, o que irá depender dos fatores imunológicos do hospedeiro (Lyons, McLeod e Roberts, 2002).

Os bradizoítos originam os cistos teciduais, os quais causam infecção latente no hospedeiro (Jardine, 1996; Hemphill, 1999). Os bradizoítos são delgados, medem 6-8 por 1-1,8 μm e contém as mesmas organelas que os taquizoítos (Dubey e Lindsay, 1996). Sua constituição e localização dentro do cisto tecidual determinam a sua maior resistência à ação do suco gástrico.

Os cistos são observados no tecido nervoso, mas podem ser encontrados em tecido muscular de bovinos e cães naturalmente infectados com *N. caninum* (Peters *et al.*, 2001a). Existem poucas informações da ultraestrutura dos cistos teciduais e bradizoítos de *N. caninum* (Figura 2) em função da escassez de cistos encontrados em animais naturalmente infectados (Speer *et al.*, 1999). O cisto tem forma oval ou elíptica, podendo medir até 107 μm (Dubey *et al.*, 1988a). Sua parede possui uma espessura de 0,5-4 μm (Dubey e Lindsay, 1996; Jardine, 1996) e apresenta contorno ondulado sem septos ou parede secundária (Speer *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2002).

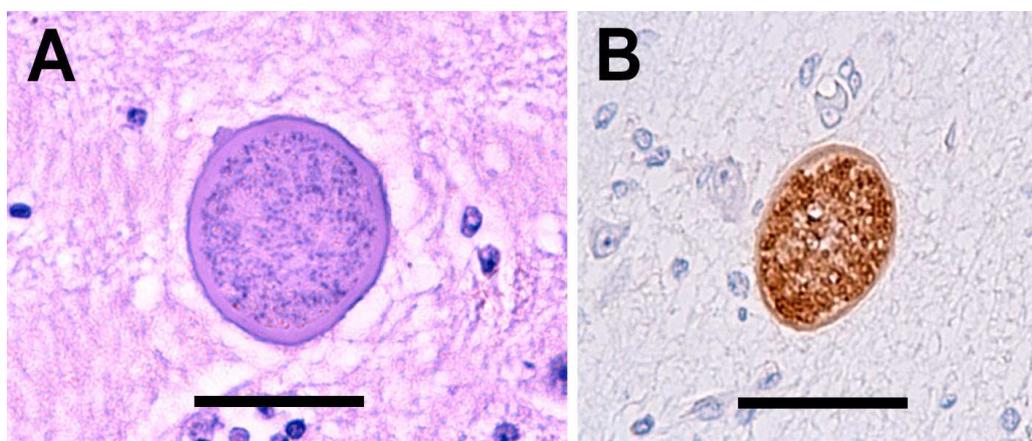


Figura 2. Cistos de *Neospora caninum* em cortes de cérebro de Gerbil. A – Coloração: hematoxilina e eosina. B - Imuno-histoquímica. Barra: 50 μm . Teixeira, 2008.

Os oocistos de *N. caninum* (Figura 3A e 3B) apresentam-se na forma esférica ou sub-esférica e medem aproximadamente de 10 a 11 μm (McAllister *et al.*, 1998). Possuem parede lisa e incolor com espessura de 0,6 a 0,8 μm . Os oocistos, quando esporulados, possuem dois esporocistos elipsoidais com 7,4-9,4 por 5,6-6,4 μm (Lindsay, Upton e Dubey, 1999b; Dubey *et al.*, 2002) e cada esporocisto contém quatro esporozoítos, de forma alongada e medindo 5,8-7,0 por 1,8-2,2 μm (Dubey *et al.*, 2002).

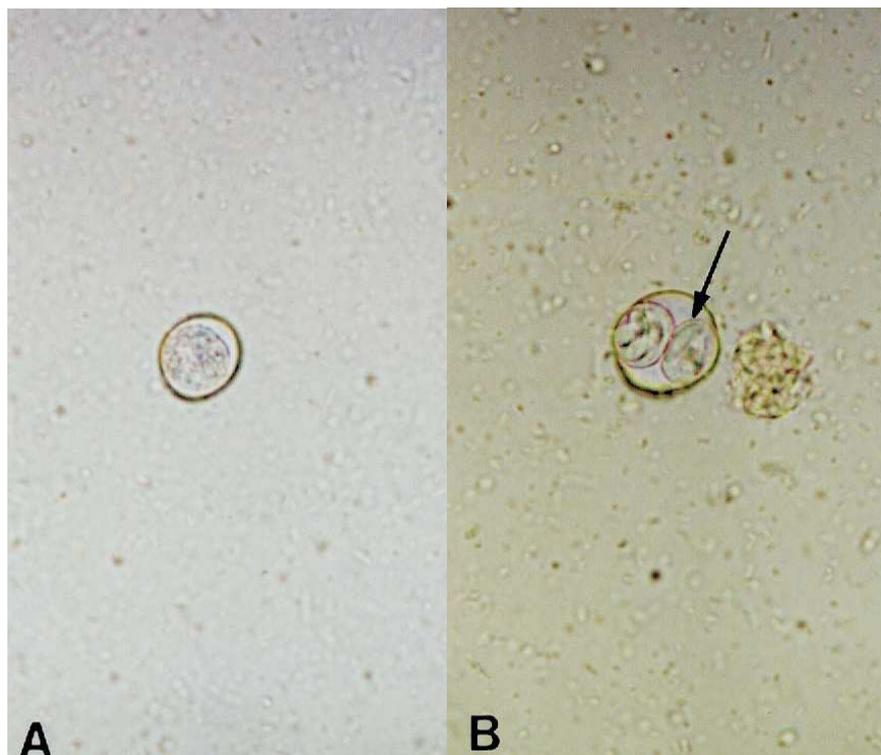


Figura 3. Oocisto de *Neospora caninum*. A – Oocisto não esporulado. B - Oocisto esporulado. Sem coloração. 400 X. Andreotti *et al.*, 2003

1.2.2 Ciclo de vida de *N. caninum*

A fim de determinar o ciclo de vida de *N. caninum* (Figura 4), McAllister *et al.* (1998), alimentaram quatro cães da raça Beagle com tecidos de camundongos infectados experimentalmente. As fezes dos cães foram analisadas por 30 dias e em três dos quatro animais foram encontrados oocistos excretados entre 8 e 27 dias. Esses oocistos apresentaram morfologia esférica a sub-esférica, esporularam com 3 dias e continham dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Os oocistos foram inoculados via oral em camundongos com genes nocauteados para expressão de interferon gama (IFN- γ) os quais se tornaram infectados.

Lindsay, Dubey e Duncan, em 1999a, confirmaram os achados de McAllister, alimentando dois cães com tecido nervoso de camundongos contendo cistos de *N. caninum*, os quais excretaram oocistos do parasito. Excreções de oocistos do coccídeo por cães naturalmente infectados foram descritos por Basso *et al.* (2001), Slapeta *et al.* (2002) e McGarry *et al.* (2003).

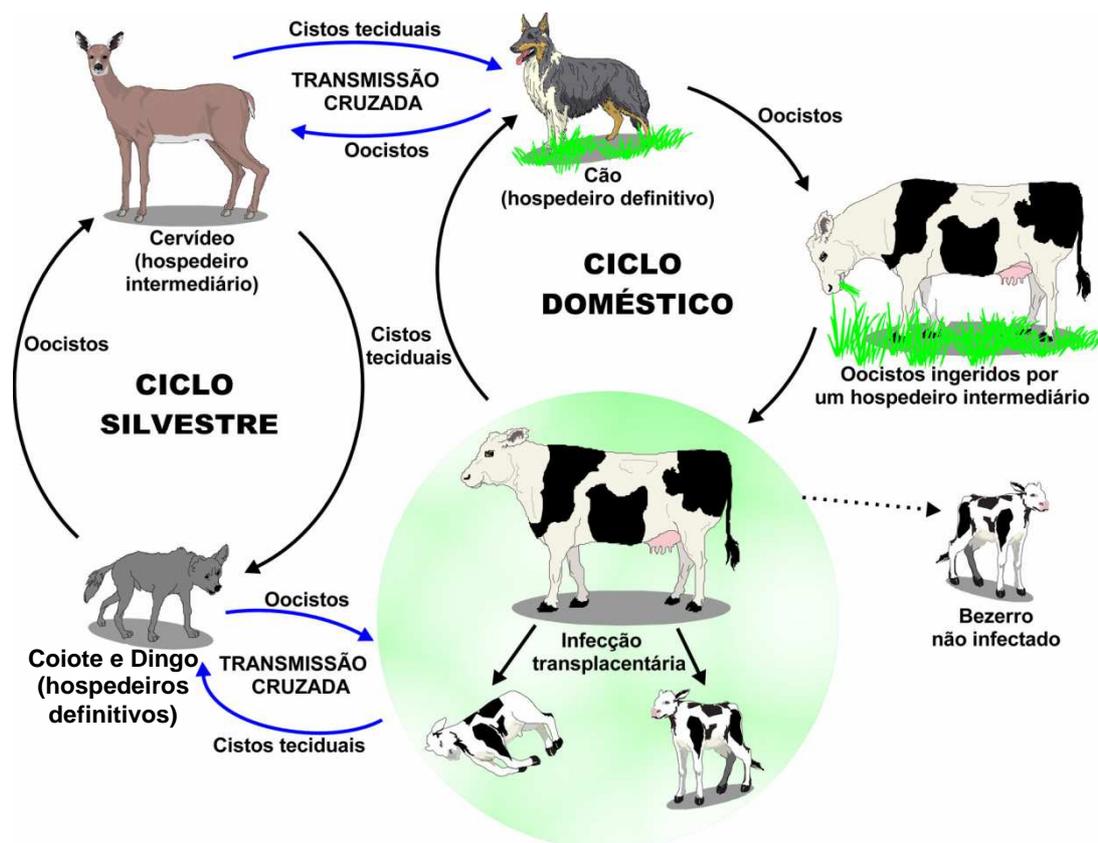


Figura 4. Ciclo de vida silvestre e doméstico de *Neospora caninum*. (Adaptado de Teixeira, 2008).

Assim como os cães, coites (*Canis latrans*) foram descritos por Gondim *et al.* (2004) eliminando oocistos de *N. caninum*. Ao alimentar quatro coites jovens com tecidos de bezerros infectados experimentalmente com taquizoítos e oocistos de *N. caninum*, observaram que um coite eliminou cerca de 500 oocistos do parasito, que foram posteriormente confirmados por PCR pelos autores.

Raposas foram avaliadas por Almeria *et al.* (2002), na possibilidade de serem hospedeiros definitivos de *N. caninum*, no entanto amostras de fezes de raposas de vida livre não apresentaram oocistos. Schares *et al.* em 2002, infectaram raposas e cães com tecidos de ovinos e caprinos previamente inoculados com *N. caninum* e observaram que dos cinco cães infectados, dois eliminaram oocistos do protozoário, enquanto que nenhuma das raposas testadas excretou oocistos.

Em 2010, na Austrália, King *et al.*, alimentaram três filhotes de dingos (*Canis lupus dingo*), criados em cativeiro e três de cães domésticos com tecido de bezerro infectado experimentalmente com *N. caninum*. Foram encontrados

oocistos no trato intestinal de um dos três dingos australianos. Esses achados confirmaram que essas espécies são também hospedeiros definitivos de *N. caninum*, podendo ocorrer transmissão horizontal do *N. caninum* de dingos para animais das fazendas e animais silvestres desta região.

N. Caninum possui um ciclo de vida heteroxeno, realizando replicação sexuada e assexuada em hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente. A replicação assexuada na forma de taquizoítos e bradizoítos encontrados nos cistos teciduais (Georgieva, Prelezov e Koinarski, 2006), acredita-se que possa ocorrer em todos os animais homeotermos. Enquanto que a reprodução sexuada na forma de esporozoítos, encontrados nos oocistos, poderia ocorrer nos canídeos (Gondim *et al.*, 2004), que também podem se comportar como hospedeiros intermediários do parasito.

São descritos para a neosporose dois tipos de hospedeiros: os intermediários e os definitivos. Os hospedeiros definitivos identificados até o momento são o cão (McAllister *et al.*, 1998), o coiote (Gondim *et al.*, 2004) e o dingo (King *et al.*, 2010).

Diversas espécies já foram descritas como hospedeiros intermediários do *N. Caninum* entre eles bovinos (Anderson *et al.*, 2000; Locatelli-Dittrich *et al.*, 2004), bubalinos (Fujii *et al.*, 2001; Gondim, Pinheiro e Almeida, 2007), equinos (Dubey *et al.*, 2001; Locatelli-Dithrichi, Hoffmann e Dittrich, 2006), caprinos (Eleni *et al.*, 2004; Figlioulo *et al.*, 2004b; Uzeda *et al.*, 2007), ovinos (Hassig *et al.*, 2003; Figlioulo *et al.*, 2004a; Romanelli *et al.*, 2007; Salaberry *et al.*, 2010), suínos (Damriyasa *et al.*, 2004), felinos (Ferroglio *et al.*, 2005; Bresciani *et al.*, 2007) e caninos (Bjerkas *et al.*, 1984; Dubey *et al.*, 1988a; Dubey *et al.*, 1988b; Dubey e Lindsay, 1989; Gondim *et al.*, 2001).

Animais silvestres também são susceptíveis à neosporose. A doença foi relatada por Woods *et al.* (1994), na Califórnia, em um cervo (*Odocoileus hemionus columbianus*) e por Peters *et al.* 2001b, na Alemanha em antílopes (*Tragelaphus imberbis*). O parasito também foi descrito através da técnica de PCR, em outros estudos envolvendo cervídeos (Soldati *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2005); coiotes e veados da cauda branca (Gondim *et al.*, 2004, Gondim, 2006); raposas (Almeria *et al.*, 2002; Hurkova e Modry, 2006); guaxinim (*Procyon lotor*) (Lemberger *et al.*, 2005) e pardais (*Passer domesticus*) (Gondim *et al.*, 2010).

A presença do *N. caninum* foi observada através de estudos sorológicos em raposas (Lindsay, Weston e Little, 2001b; Hurkova e Modry, 2006); lobos (Vitaliano *et al.*, 2004); rinoceronte (Sangster *et al.*, 2010); alpacas, camelos, lhamas (Hilali *et al.*, 1998; Sadrebazaz, Haddadzareh e Shayan, 2006) e capivaras (Yai *et al.*, 2008). Andre *et al.* (2010) relataram a soroprevalência de *N. caninum* em carnívoros silvestres mantidos em cativeiros nos zoológicos do Brasil.

Huang *et al.*, 2004 identificaram o *N. caninum* em ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) de vida livre, por meio da técnica de PCR. Jenkins *et al.* (2007) também detectaram *N. caninum* por PCR em ratos e camundongos naturalmente infectado. Este achado é relevante, uma vez que ratos e camundongos são animais cosmopolitas, e quando predados por outras espécies podem estar veiculando a infecção pelo protozoário para outras regiões (Gondim, 2006).

Alguns fatores de risco podem favorecer a disseminação do agente, aumentando o risco de exposição dos hospedeiros suscetíveis, tais como: a criação de espécies diferentes criadas no mesmo ambiente aumentando a exposição aos hospedeiros susceptíveis (Wouda *et al.*, 1999; Lindsay, Ritter e Brake, 2001a); a alimentação dos cães com os resíduos da carcaça de animais abatidos sem o devido tratamento, contribuindo significativamente para a disseminação do parasito (Souza, 2001) e o grau de contaminação ambiental causada pela eliminação do agente ao meio externo através de secreções e excreções (McAllister *et al.*, 1998).

1.3. Formas de Transmissão

A transmissão de *N. caninum* pode ser horizontal, onde a contaminação ocorre principalmente pela ingestão de oocistos espalhados pelas fezes de hospedeiros definitivos; ou vertical, a partir de uma matriz gestante infectada, onde os taquizoítos atravessam os placentônios, infectando os fetos (Dubey, 2003; Gondim, 2006). Ambas são importantes vias de infecção (Dubey e Lindsay, 1996).

Na transmissão horizontal em bovinos, os canídeos consomem os cistos de *N. caninum* dos tecidos do hospedeiro intermediário e eliminam oocistos nas

fezes contaminando pastagens, silagem ou água (McAllister, 1998; Dijkstra *et al.*, 2001; Dubey, 2003; Gondim *et al.*, 2004; Dubey, Buxton e Wouday, 2006; King *et al.*, 2010). Todos os tecidos contendo cistos viáveis (placentas, fetos de bovinos e carcaças de bezerras), podem ser infectantes para os canídeos, como via de transmissão horizontal (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay, Dubey e Duncan, 1999a).

A transmissão vertical, aquela que ocorre de mãe para feto, ainda na gestação, foi demonstrada em bovinos, ovinos, caprinos, felinos e macacos (Davidson *et al.*, 1999; Buxton, McAllister e Dubey, 2002). Essa forma de transmissão tem sido considerada a principal forma de disseminação do *N. caninum* em rebanhos bovinos, mantendo, dessa forma, a infecção por várias gerações (Bjorkman *et al.*, 1996). Uma vaca cronicamente infectada pode transmitir a infecção ao feto por sucessivas gestações e pode apresentar um ou mais abortos durante a sua vida reprodutiva (Locatelli-Dittrich *et al.*, 2001).

Trees e Williams (2005) propuseram a utilização dos termos exógena e endógena para descrever a origem da infecção transplacentária em bovinos. A transmissão transplacentária exógena demonstra que a infecção fetal originou-se a partir da ingestão de oocistos pela vaca. Já a transmissão endógena reflete a recrudescência de infecção persistente da vaca com a conseqüente passagem do parasito para o feto.

Apesar de não revelar a mesma intensidade dos sinais clínicos clássicos da doença em bovinos, a transmissão vertical ou transplacentária vem também se reproduzindo em cães (Cole *et al.*, 1995). Cadelas infectadas subclínicamente podem transmitir *N. caninum* para seus fetos, fazendo com que ninhadas sucessivas possam nascer infectadas.

1.4. Resposta Imune

O conhecimento dos aspectos imunológicos que podem estar envolvidos na infecção dos animais pelo *N. caninum* é importante para permitir o entendimento da patogênese da neosporose, assim como, no estabelecimento de estratégias de controle (Anderson, Andrianarivo e Conrad, 2000). Por ser um parasito intracelular obrigatório (Hemphill, 1999) a resposta mediada por células é fundamental para a imunidade do hospedeiro. O parasito é capaz de estimular uma resposta imune celular e humoral, assim como as células do sistema imune

inato a sintetizarem Interleucina 12 (IL-12), induzindo produção local de Interferon Gama (IFN- γ). As 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).

A neosporose pode ser fatal quando o hospedeiro infectado não possui uma resposta imune eficaz que desempenhe um papel fundamental no controle da fase aguda da doença (Baszler *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Long e Baszler, 2000; Nishikawa *et al.*, 2003) por limitar a multiplicação do *N. caninum* (Marks *et al.*, 1998). O IFN- γ e a IL-12 são citocinas importantes na proteção natural contra a infecção mediada pelo *N. caninum* (Sher *et al.*, 2003). Khan *et al.* (1997) e Nishikawa *et al.* (2001) observaram que a ausência de IFN- γ em ratos, os tornou mais susceptíveis à neosporose.

A infecção por *N. caninum* é dependente de respostas imunes mediadas por citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos TCD4+, com a imunidade mediada por células exercendo papel fundamental no controle da infecção (Hemphill, 1999; Hunter e Reiner, 2000), principalmente em função da ação sinérgica entre linfócitos TCD4+ e TCD8+, macrófagos e células “Natural Killer” (NK). Durante a infecção aguda, a IL-12 é produzida por células fagocitárias infectadas, diferenciando linfócitos TCD4+ e TCD8+ em células produtoras de citocinas pró-inflamatórias e estimulando células NK a produzirem IFN- γ . Além disso, ativam macrófagos e eliminam células infectadas pelo parasito, através de mecanismos mediados por óxido nítrico (NO) (Staska *et al.*, 2003; Boysen *et al.*, 2006; Williams e Trees, 2006).

As células TCD4⁺ são essenciais para a produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum* em estágios tardios de infecção, induzindo a outros mecanismos de proteção (Tanaka *et al.*, 2000). Células TCD8⁺ podem conferir uma proteção maior ao parasito, em relação às células TCD4⁺. As células TCD8⁺ apresentam-se como células citotóxicas, desta maneira agem limitando a disseminação do parasito através do reconhecimento direto ou pela ação de citocinas (Spencer *et al.*, 2005).

O IFN- γ aciona os fagócitos, ativando neutrófilos e macrófagos, por linfócitos T (TCD4⁺ e TCD8⁺) e células NK (Brake, 2002; Williams *et al.*, 2007). Neutrófilos e macrófagos são as células que atuam como primeira linha de defesa eliminando diretamente o parasito por fagocitose. Nesse processo são produzidos

intermediários reativos como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e intermediários reativos do nitrogênio como NO, os quais destroem os protozoários intracelulares controlando a replicação parasitária (Tonks *et al.*, 2001; Denkers *et al.*, 2004; Innes *et al.*, 2005). Pinheiro *et al.* (2006a) encontraram um aumento na produção de NO e elevação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) em culturas de astrócitos de ratos, infectadas *in vitro* com *N. caninum*. Em 2010, Pinheiro *et al.*, observaram que os níveis de NO já se encontravam aumentados 24 horas após a infecção *in vitro* com *N. caninum* em culturas mistas de células gliais em ratos.

Yamane *et al.* (2000) verificaram que o crescimento do parasito foi inibido após a adição de IFN- γ em co-culturas de células gliais e neurônios obtidos de cérebro bovino, infectadas com taquizoítos. Pinheiro *et al.* 2006b, realizaram estudos utilizando culturas primárias de células gliais de ratos infectadas com o *N. caninum*, e observaram altos níveis de Interleucina 10 (IL-10) e (IL-6), sugerindo o provável efeito regulador destas citocinas, na proteção do sistema nervoso.

O título de anticorpos anti-*N.caninum* é uma importante ferramenta diagnóstica, entretanto, pouco se sabe a respeito da eficácia dos anticorpos contra o parasito. Especula-se que os anticorpos tenham um papel auxiliar no controle da infecção, participando da neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares, podendo, assim, reduzir a disseminação do agente (Innes *et al.*, 2002). Uma ausência de linfócitos B em camundongos geneticamente modificados levou a uma falha no controle da infecção, desta forma os anticorpos podem ter papel relevante no controle da infecção (Eperon *et al.*, 1999; Ammann *et al.*, 2004).

Em cães os títulos de anticorpos apresentados por animais infectados são geralmente baixos. Esses animais em sua maioria não desenvolvem resposta humoral frente ao desafio, produzindo anticorpos IgG específicos somente após 4 semanas, prazo este que pode se estender por quase 500 dias (Schaes *et al.*, 2001). Em outras espécies estudadas a resposta mediada por anticorpos da classe IgG não foi tardia, porém geralmente apresentaram baixos níveis séricos por curtos períodos de tempo (McGuire *et al.*, 1999; Mineo *et al.*, 2005). Os bovinos geralmente apresentam uma rápida soroconversão, com altos títulos, e tendem a manutenção de positividade durante um longo período (Dijkstra *et al.*, 2003).

Em fêmeas prenhes, respostas imunes predominantemente Th1 são incompatíveis com o sucesso de uma gestação (Raghupathy, 1997). Os altos níveis de progesterona mantidos durante a gestação induzem há uma imunomodulação da resposta da fêmea, levando à expressão de citocinas para um padrão Th2 nos linfócitos TCD4⁺ (Innes *et al.*, 2002).

Quando a infecção por *N. caninum* ocorre no primeiro terço de gestação, há um baixo risco de transmissão transplacentária. Isso se deve a resposta imune da vaca que é predominantemente do tipo Th1, com produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α . Essa resposta é efetiva contra *N. caninum*, mas pode interferir na sobrevivência do feto (Entrican, 2002; Innes *et al.*, 2002; Quinn, Ellis e Smith, 2002).

Com o avanço da gestação, há um aumento na produção de progesterona a qual estimula a conversão da resposta Th1 para a resposta celular do tipo Th2, com aumento nos níveis de citocinas como Interleucina 4 (IL-4), 5 (IL-5) e 10 (IL-10). Esse perfil de citocinas apesar de favorável ao desenvolvimento fetal é pouco efetiva no controle da infecção (Entrican, 2002; Quinn, Ellis e Smith, 2002; Innes *et al.*, 2005). Nesta fase uma resposta discreta do feto começa a ser estabelecida, apesar de não ser suficiente para protegê-lo, uma vez que a maioria dos abortos acontece nesse período (Anderson, Andrianarivo e Conrad, 2000).

No terceiro trimestre de gestação, o risco de abortamento é baixo devido ao desenvolvimento do sistema imune fetal, porém o risco de transmissão transplacentária do parasito é maior devido ao estabelecimento da resposta Th2 (Quinn, Ellis e Smith, 2002; Williams *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2004). Quando a infecção ocorre no último terço de gestação geralmente o feto sobrevive, entretanto, nasce infectado e pode apresentar-se clinicamente sadio (Dubey e Lindsay, 1996; Buxton, McAllister e Dubey, 2002).

2. SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sistema nervoso central (SNC) tem sido considerado um sítio imunologicamente privilegiado pela existência da barreira hemato-encefálica, pela falta de drenagem linfática, a expressão reduzida dos principais complexos de histocompatibilidade (MHC) e a aparente ausência de células apresentadoras de antígenos (APCs). Por outro lado, apesar de restrito a migração de proteínas do

plasma e células imunológicas no parênquima, o SNC é bem conhecido e constantemente supervisionado por todo o sistema imunitário (Streit, Walter e Pennell, 1999).

O estudo microscópico do SNC revelou a estrutura complexa e heterogênea dos tipos celulares, divididos em neurônios e células gliais (Hansson, 1982). As células gliais compreendem a 65% das células do SNC nos roedores e 90% em humanos. Essas células facilitam a sinalização entre o corpo celular, os dendritos e axônios dos neurônios. Participam da separação e isolamento dos grupos neurais e conexões sinápticas, promovem a fagocitose de fragmentos celulares após lesão e morte do neurônio; estimulam a defesa e participam da captação de nutrientes, oxigênio e homeostase do SNC (Tardy, 1991; Barres e Barde, 2000).

O conjunto das células gliais do SNC, divide-se em 3 grupos principais (Figura 5). A macroglia que é constituída pelos oligodendrócitos, que formam a mielina, e pelos astrócitos que compreendem 50% de toda a massa cerebral e são as células gliais mais abundantes no SNC. As microglias que são células fagocíticas envolvidas nas respostas inflamatórias. E pelas células ependimárias que revestem os ventrículos cerebrais (Perea e Araque, 2007; Jessen, 2004). Os astrócitos e a microglia são as duas principais populações de células reativas a danos neuronais e as alterações no microambiente cerebral (Lent, 2001; Streit, Walter e Pennell, 1999).

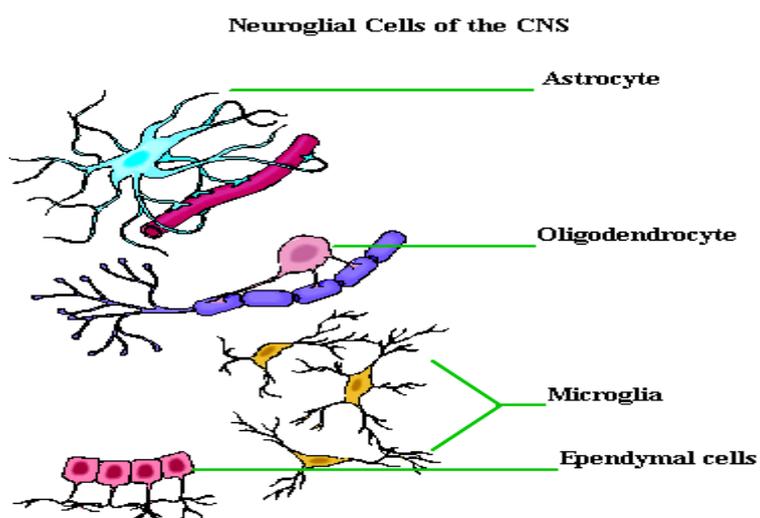


Figura 5. Células da Glia do SNC: Astrócito, oligodendrócito, microglia e células ependimárias. <http://www.neuralsystem.com.br/>

2.1. Astrócitos

Os astrócitos constituem a maioria das células da neuroglia correspondendo a cerca de 60-70% do seu total. Estas células compõem o revestimento interno da parede das cavidades intercerebrais e das meninges, formando uma proteção dos capilares sanguíneos do SNC, constituindo a base física da barreira hemato-encefálica (Bignani, 1991; Iadecola, 2004; Kim *et al.*, 2006; Stipursky *et al.*, 2012). Devido à presença desta barreira, células imunológicas periféricas não se difundem para o cérebro, permitindo desta forma que as células gliais residentes, os astrócitos e as microglias, sejam responsáveis pela resposta imunológica no cérebro (Iadecola, 2004; Rock *et al.*, 2004; Gee e Keller, 2005; Kim *et al.*, 2006).

Participam juntamente com as microglias, do aporte energético aos neurônios; da manutenção da homeostase extracelular, através do tamponamento do meio externo; da regulação da transmissão sináptica e da neurogênese no adulto (Tardy, 1991; Baumann e Pham-Dinh, 2001; Costa *et al.*, 2002; Nadarajah, 2003; Pekny e Nilsson, 2005). Os astrócitos controlam a concentração extracelular de potássio, a neurogênese, a neuritogênese, a formação e transmissão sináptica, a proliferação, migração e sobrevivência neuronal (Wang *et al.*, 1994; Pfrieger e Barres, 1997; Gomes *et al.*, 1999; Lim e Alvarez-Buylla, 1999; Freire *et al.*, 2004; Christopherson *et al.*, 2005; Araque, 2006; Lima *et al.*, 2007).

Os astrócitos são considerados células de apoio ao funcionamento neuronal. As células da glia estão diretamente relacionadas com a formação e armazenamento de glicose, sendo o glicogênio estocado predominantemente em astrócitos no SNC. Em situações onde o consumo excede a disponibilidade de glicose (hipoglicemia), o glicogênio é degradado a glicose que pode ser metabolizada, via glicólise, a lactato que é fornecido e captado por neurônios, garantindo assim o fornecimento de energia (Pellerin e Magistretti, 2004; Dienel e Cruz, 2006).

Esse grupo celular participa de vários processos fisiológicos e metabólicos. São conhecidos por responder tanto a fatores inflamatórios, como imunes, promovendo a proliferação, e a liberação de citocinas, suprimindo a ativação,

proliferação e função efetora de células T invasoras, podendo atuar também como células apresentadoras de antígenos (Eddleston e Mucke, 1993; Noremborg, 1994; Gimsa *et al.*, 2004).

Os astrócitos ativos são capazes de produzir numerosas citocinas pró e antiinflamatórias (Iadecola, 2004; Rock *et al.*, 2004; Gee e Keller, 2005; Kim *et al.*, 2006). Eles expressam vários receptores para neurotransmissores incluindo receptores para glutamato, GABA, noradrenalina, acetilcolina e outros (Perea e Araque, 2007). Essas células contribuem para a resposta imune do SNC contra agentes químicos, infecciosos ou traumatismos (Barres e Barde, 2000, Pekny e Nilsson, 2005) e recentemente um novo papel dos astrócitos na maturação neuronal, como mediadores da ação de biolipídios no córtex cerebral foram apresentados por Stipursky *et al.* (2012).

Os astrócitos regulam e produzem inúmeros fatores tróficos que regulam a morfologia, proliferação e a sobrevivência de neurônios e células gliais inclusive dos próprios astrócitos (Lent, 2001; Gee e Keller, 2005; Stipursky *et al.*, 2012). Esse processo, demonstrado pela capacidade de proliferação, juntamente com um aumento de expressão de proteína ácida do gliofilamento (GFAP) promove o que se chama de cicatriz glial ou astrocitária (Figura 6A e 6B).

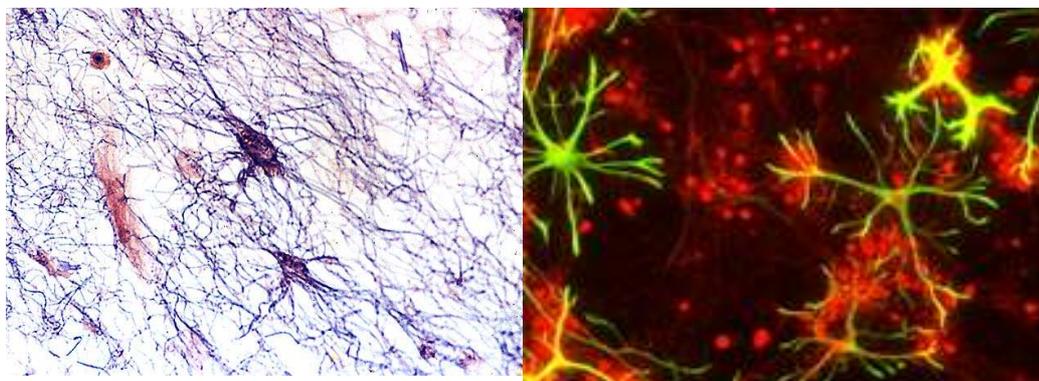


Figura 6. Astrócitos fibrilares em cicatriz glial. A - Hematoxilina fosfotúngstica, 500x. B – Imunofluorescência. <http://www.infomedula.org/>

A GFAP, subunidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular está presente no citoplasma de astrócitos. Técnicas imuno-histoquímicas com anticorpos primários anti-GFAP são empregadas para identificar astrócitos no sistema nervoso, apresentando-se como marcador exclusivo desse tipo celular e responsável pela forma típica destas células (Kimelberg, 2004). O aumento

durante as lesões nos tecidos nervosos sinaliza a reatividade astrocitária (Benveniste, 1992). Essas alterações constituem um fenômeno conhecido como astrogliose ou gliose. A presença abundante dos astrócitos em áreas lesadas no tecido nervoso caracteriza um processo semelhante ao da resposta inflamatória em outros tecidos do organismo (Norenberg, 1994).

Em processos patológicos, os astrócitos respondem prontamente, e, por outro lado, alterações celulares em astrócitos são indicadores confiáveis de lesão do sistema nervoso central (SNC). Disfunções astrocitárias podem estar associadas a doenças e distúrbios neurológicos (Stipursky *et al.*, 2012). As células gliais são elementos essenciais no desenvolvimento de vários distúrbios neurológicos, a exemplo de epilepsia, depressão, esquizofrenia, e doenças neurodegenerativas, dentre outras, Alzheimer, Parkinson, doenças de Huntington e Esclerose Amiotrófica Lateral (ALS) (Seifert, Schilling e Steinhauser, 2006; Barres, 2008). Fawcett e Asher (1999) sugeriram que os astrócitos podem ativar a maturação e a proliferação de células-tronco nervosas adultas. Além disso, fatores de crescimento produzidos pelos eles podem ser críticos na regeneração dos tecidos cerebrais ou espinhais danificados por traumas ou enfermidades.

2.2. Microglias

As microglias são as células imunes do sistema nervoso central e desempenham papéis importantes em infecções cerebrais e inflamação. No cérebro jovem sadio, essas células apresentam um fenótipo amebóide e no adulto, tais células passam a apresentar um fenótipo ramificado, passando a ser chamadas de microglia ramificada (Vilhardt, 2005). Esse fenótipo residente do cérebro adulto está num estado de permanente “alerta”, sendo capaz de perceber pequenas alterações no ambiente, conferindo-lhes a capacidade de examinar continuamente todo o parênquima cerebral de forma bastante eficiente (Nimmerjahn, Kirchhoff e Helmchen, 2005; Garden e Moller, 2006; Hanisch e Kettenmann, 2007; Wake, Moorhouse e Nabekura, 2012).

As microglias são encontradas em todo o cérebro e na medula espinhal correspondendo a aproximadamente 10% da população adulta celular (Lawson *et al.*, 1990). O papel já muito bem descrito de fagocitose de microorganismos, típico de macrófagos, é apenas uma das muitas funções das microglias. Elas não só

mantêm o SNC livre de organismos invasores, como exercem o papel de células apresentadoras de antígeno para os linfócitos, uma vez que expressam MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe II, fazem a fagocitose de resíduos celulares, assim como de axônios transitórios e células apoptóticas durante o desenvolvimento, e ainda secretam fatores neurotróficos, possibilitando, dessa forma, a perfeita homeostase do sistema nervoso (Mallat, Marin-Teva e Cheret, 2005; Vilhardt, 2005; Lima *et al.*, 2009).

As microglias desempenham um papel importante no sistema imune do SNC. A sua ativação atua na regulação da inflamação do SNC, bem como no potencial desta como neuroprotetor e como proregenerativo (Figura 7). No cérebro sadio a microglia mantém a viabilidade neuronal, e em troca recebe informações dos neurônios e demais células gliais, para permanecer quiescente. Em resposta a estímulos nocivos, a microglia sofre ativação que pode ser benéfica para o hospedeiro, quando os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os de citocinas secretadas são mantidas em níveis baixos e/ou transitórios; por outro lado, esses mecanismos se tornam neurotóxicos quando há uma elevação destes níveis podendo levar à disfunção neuronal e morte celular, que contribuem para ativação microglial (Vilhardt, 2005).

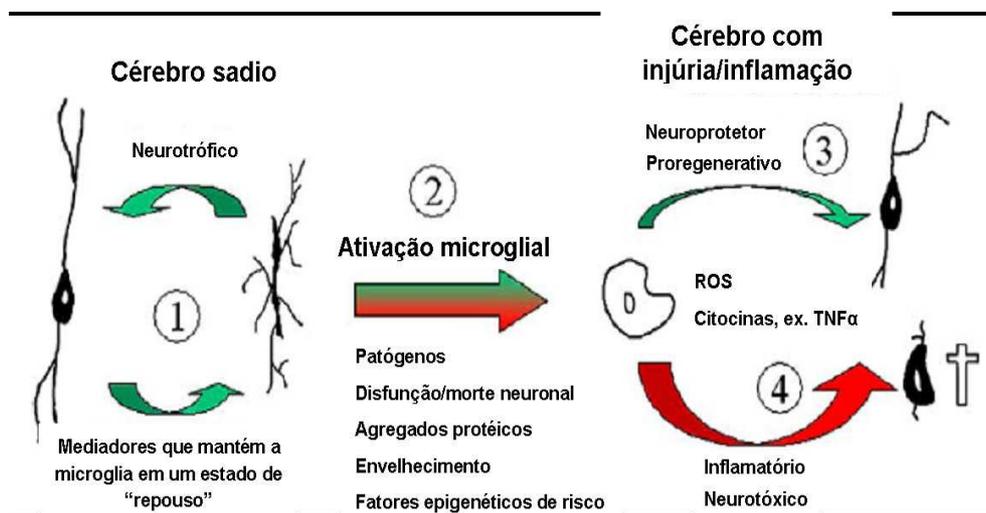


Figura 7: Mudanças morfológicas durante a ativação microglial. (Adaptado de Vilhardt, 2005).

Em lesões no SNC ou na presença de microorganismos, há proliferação das células da microglia residente (Ajami *et al.*, 2007) tornando-as ativas,

passando a ser chamada de microglia amebóide (ou macrófagos cerebrais) (Vilhardt, 2005). Nesta fase, as células apresentam uma alta taxa metabólica, sintetizando e secretando diversas citocinas – principalmente inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF α , alguns superóxidos, como o NO, além de liberação de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (Vilhardt, 2005). A função anormal das microglias, especialmente em fases iniciais de desenvolvimento, pode causar hiperexcitabilidade de redes neurais que podem contribuir para doenças tais como Alzheimer e Parkinson (Dickson *et al.*, 1993).

Quando a inflamação cessa as citocinas e superóxidos deixam de ser liberados no meio (Vilhardt, 2005; Garden e Moller, 2006). O destino das células da microglia após a ativação permanece desconhecido, no entanto, discute-se a possibilidade de que estas células retornem ao estado ramificado ou sofram apoptose ou ambos os eventos (Garden e Moller, 2006; Hanisch e Kettenmann, 2007).

Recentemente Wake, Moorhouse e Nabekura (2012), relataram que as microglias parecem estar particularmente envolvidas no controle da integridade da função sináptica. Esses autores indicaram que as microglias contribuem para apoptose dos neurônios progenitores durante a neurogênese, o que pode levar a compreensão das doenças onde ocorre alteração da neurogênese.

2.3. Mediadores químicos

Mediadores químicos atuam por meio de sinalização intercelular, determinando o desencadeamento ou a inibição dos processos inflamatórios. Esse sistema de sinalização intercelular é muito ativo durante as doenças neurodegenerativas, infecciosas e em condições como traumatismo e isquemias do SNC (Klein *et al.*, 2000; Venters, Dantzer e Kelley, 2000).

Dentre os mediadores químicos, o óxido nítrico (NO), é uma molécula gasosa de radical livre que se difunde rapidamente através das membranas celulares, participando de ações fisiológicas e patológicas, incluindo neurotransmissão e a inflamação (Zhou *et al.*, 2006). Essa molécula é um mensageiro intracelular que apresenta várias funções no SNC (Vincent, 1994; Bredt e Snyder, 1994), tem ação sobre a destruição de microrganismos, parasitos e células tumorais (Dusse, Vieira e Carvalho, 2003), podendo ser produzido frente

a uma infinidade de antígenos (Dawson *et al.*, 1991; Nathan, 1992; Lipton *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1993, Vincent, 1994). É sintetizado em células neuronais, endoteliais, imunitárias, dentre outras. Em astrócitos, a síntese do NO pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1 β e IFN γ (Brown *et al.*, 1995; Won *et al.*, 2004).

O NO possui três isoformas: sintetase neuronal (nNOS), sintetase indutível ou macrófagica (iNOS) e sintetase endotelial (eNOS) (Olensen, 2008). Induzida por diversas células como fibroblastos, macrófagos e no epitélio do corpo ciliar, especialmente após liberação de TGF- β e estimulação por citocinas como a IL-1, o TNF- α e lipopolissacarídeos (LPS), a iNOS eleva os níveis de NO (Berger e Savitz, 2008).

Quando induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, demonstrando seu envolvimento em vários processos patológicos. Os elevados níveis de NO produzidos por macrófagos, neutrófilos ou outras células ativadas, que deveria ser tóxico para microrganismos, parasitos ou células tumorais, pode lesar células saudáveis vizinhas. Este mecanismo é responsável pela maioria de processos inflamatórios e auto-imunes (Flora Filho e Zilberstein, 2000).

3. MEL

3.1. Histórico do mel

O mel é definido como um produto alimentar de aspecto viscoso, aroma agradável e sabor doce cuja matéria-prima principal para a sua elaboração é o néctar nos méis florais. Esse néctar pode ser também elaborado a partir das secreções de partes vivas das plantas ou de exsudados e excreções de (afídios) insetos sugadores formando os méis de melato (Campos e Modesta, 2000; Campos *et al.*, 2003; Marchini, Moreti e Otsuk, 2005). O mel tem em sua composição uma mistura complexa de carboidratos, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e sais minerais (Weston e Brocklebank, 1999; Mendes *et al.*, 2009).

Evidências de seu uso aparecem desde a Pré-história (Arnaud *et al.*, 2008). No mesmo período, a própolis já era utilizada em aplicações medicinais para combater infecções, mas também, em embalsamamento. O mel tem sido

empregado pelo homem, há mais de 6000 anos, seja como alimento (Masson, 1994) ou como medicamento, devido às suas propriedades anti-sépticas, atividades antimicrobianas, regenerantes e cicatrizantes dos tecidos epiteliais e para conservação de frutas e grãos (Cortopassi-Laurino e Gelli, 1991; Delmas, Vidon e Sebald, 1994).

Esse alimento atraiu a atenção, principalmente pelas características adoçantes, que levaram ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais aprimoradas, com o intuito de induzir uma maior produtividade das abelhas (Bera e Almeida-Muradian, 2007). Nos períodos pré-hispânicos o mel juntamente com o pólen das abelhas nativas sem ferrão, era utilizado, na dieta das comunidades indígenas americanas (Alves *et al.*, 2005). No Brasil até o século XIX, o mel e a cera empregados na alimentação pelos índios e brancos e na confecção de velas pelos jesuítas, eram provenientes das abelhas sem ferrão (Nogueira-Neto, 1997).

No Brasil, além da *Apis mellifera* introduzida por imigrantes europeus, são encontradas outras abelhas nativas, pertencentes à subfamília Meliponinae. As abelhas dessa subfamília representam 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 *Tetragonisca angustula* tem porte pequeno e é popularmente conhecida como jataí.

Os meliponíneos ocupam grande parte das regiões de clima tropical do planeta e regiões de clima temperado subtropical. Assim, essas abelhas são encontradas na maior parte da América Neotropical, em sua maioria no território Latino-Americano (Nogueira-Neto, 1997). No Brasil apresenta ampla distribuição geográfica, 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. (Nogueira-Neto, 1997; Silveira, Melo e Almeida, 2002). São abelhas mansas e facilmente adaptáveis, podendo ser criadas em áreas rurais ou urbanas. Possuem manejo facilitado, dispensando o uso de equipamentos de proteção e possibilitando o emprego de mão de obra familiar. As meliponinas podem produzir de 0,5 a 1,5 L de mel/ano em colônias fortes (Lopes, Ferreira e Santos, 2005).

3.2 Utilização do mel

O mel é considerado como o produto apícola mais fácil de ser explorado e também o mais conhecido com possibilidades de comercialização. A quantidade de mel obtida pode variar em função dos fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, número de dias que as flores o secretam, com a concentração e proporções de seus carboidratos e com a quantidade de flores da área (Marchini, Moreti e Otsuk, 2005).

Como alimento, é comum o consumo do mel em seu estado natural, seja ele líquido, cristalizado ou nos favos (Figura 8) (Azeredo *et al.*, 2003). O mel é empregado como ingrediente de alimentos fabricados, principalmente produtos a base de cereais, por sua doçura, cor, flavor, caramelização e viscosidade (La Grange e Sanders, 1988). Além disso, tem sido utilizado como condimento, aromatizante, adoçante e, produtos lácteos a base de mel. Na indústria de bebidas não alcoólicas, o seu uso como adoçante em sucos se expandiu na década de 90 (Olaitan, Adeleke e Ola, 2007). O mel é também utilizado como suplemento alimentar na terapia médica (Azeredo *et al.*, 2003).



Figura 8. Colméia de *T. angustula*. Fonte: Arquivo pessoal.

A meliponicultura tem despertado o interesse de produtores e pesquisadores. A valorização desta no mercado tem levado ao desenvolvimento de variados estudos, voltados para o conhecimento de aspectos da biologia e do

comportamento. Assim como, da caracterização dos produtos das colônias em relação a seus constituintes nutricionais e farmacológicos (Souza, 2007).

3.3 Propriedades terapêuticas do mel

As propriedades do mel de abelha são consideradas como fonte natural de saúde devido às suas qualidades terapêuticas (Silva, Queiroz e Figueirêdo, 2004). Por conseguinte, vem sendo utilizado em indústrias farmacêuticas e cosméticas (Freitas, Khan e Silva, 2004; Hosny, El-Ghani e Nadir, 2009). O mel tem sido mencionado por suas variedades de propósitos medicinais e nutricionais (Molan, 2001) tais como: atividade antimicrobiana (Cooper, Molan e Harding, 1999; Dos Santos *et al.*, 2003; Snow e Manley-Harris, 2004), protetor de mucosa contra doenças gastrointestinais (Prakash *et al.*, 2008), anti-oxidante (Al-Mamary, Al-Meerri e Al-Habori, 2002; Aljadi e Kamaruddin, 2004), prebiótica (Roberfroid, 2000; Shan, 2001) e antiinflamatória (Tonks *et al.*, 2003; Tonks *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2009). Dentre as suas aplicações considera-se sua utilização como medicamento para o tratamento de feridas infectadas. Tendo sido utilizado também como auxiliar em terapêuticas médicas (Olaitan, Adeleke e Ola, 2007). Molan (1992) descreve a sua eficácia na limpeza rápida de feridas infectadas, além da ação ativa na cicatrização. Quando é empregado informalmente como medicamento, o mel pode ser ingerido na sua forma convencional ou associado a outras receitas populares (Azeredo *et al.*, 2003).

Orsi *et al.*, (2000), observaram que própolis promoveu o aumento na produção de NO e H₂O₂, associado ao aumento da atividade de macrófagos peritoneais de camundongos. O mel aumenta a concentração de NO na saliva de indivíduos normais (Al Waili, 2003) e sua administração intravenosa e intrapulmonar promove melhoria da função renal e hepática, da função da medula óssea e do perfil lipídico (Al Waili e Boni, 2003; Al-Waili e Haq, 2004).

Tonks *et al.* (2003) utilizando o mel como estimuladores de resposta antiinflamatória em humanos, perceberam uma ação mediadora de citocinas como TNF, IL-6 e IL-1 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Ansorge, Reinhold e Lendeckel, (2003) identificaram as propriedades antiinflamatórias do mel em células imune humanas. Através do aumento na produção do fator transformador de crescimento-β1 (TGF-β1), demonstraram que

o mel tem efeito na regulação das propriedades das células imunes, influenciando diferentes tipos de respostas provavelmente pela imunoregulação das células T. Tonks *et al.* (2007) isolaram o componente 5,8KDa do mel, que estimula a produção de TNF, via TLR4, mecanismos envolvidos na estimulação da produção de citocinas que levaram à regulação do crescimento de linfócitos. Tais mecanismos podem levar ao desenvolvimento de novas terapêuticas para o tratamento de pacientes com feridas agudas e crônicas.

O mel tem efeito modulador por possuir atividade mitótica em células B e linfócitos T, além de reduzir os efeitos da produção de espécies reativas do oxigênio intermediário (ROI) e limitar os danos aos tecidos, provocados pelos macrófagos ativados durante o processo de cicatrização (Tonks *et al.*, 2001).

Han *et al.*, (2007), avaliaram a efeito do mel na produção de NO e de TNF em células gliais. Observaram que o mel inibe a produção de TNF- α que foram previamente estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) e que esta inibição está estreitamente associada com a supressão de NO. Desta forma, o mel poderia ser um poderoso regulador da inflamação com potencial para ser um agente terapêutico contra uma série de doenças.

No Mato Grosso do Sul, Conti *et al.* (2007) compararam os méis de abelha *T. angustula* e *A. mellifera*, por análises físico-químicas. O mel produzido pelas *T. angustula* mostrou-se mais aquoso e mais ácido do que o mel de *A. mellifera*. O mel de *T. angustula* é mais líquido do que o mel de gênero *Apis*, por isso é mais rapidamente absorvido quando passado na pele (Bijlsma *et al.*, 2006).

O mel de *T. angustula* apresenta ação imunológica, analgésica, sedativa, expectorante, hipossensibilizadora e antibacteriana (Breyer, 1983). Essas propriedades estão geralmente relacionadas às suas características físico-químicas. No mel natural a osmolaridade e a acidez, promovem o efeito inibitório sobre o crescimento microbiano (Tovey, 1991; Molan, 1999). Estudos foram focados na identificação e na ratificação da atividade antimicrobiana e constataram que esta não deve estar vinculada somente à alta concentração de açúcares, mas também a produção de H₂O₂, um composto gerado pelo sistema enzimático glicose oxidase (Molan, 1992; Bogdanov, 1997). Posteriormente, foram descobertos outros agentes antimicrobianos como substâncias fitoquímicas incluindo ácidos fenólicos e flavonóides (Weston, 2000). Assim, a atividade

individual ou sinérgica destes fatores desempenha um papel como antimicrobiano (Iurlina *et al.*, 2009).

Gonçalves, Alves Filho e Menezes, (2005) observaram com sucesso a atividade antimicrobiana *in vitro* do mel da abelha indigena *Nannotrigona testaceicornis*, pertencentes à tribo Trigoni, a mesma das abelhas jataí, contra diferentes microorganismos isolados de focos infecciosos. A eficácia do mel de abelhas jataí (*T. angustula*) em cultivo misto de bacilos, cocos e leveduras, microorganismos facilmente encontrados no conduto auditivo de caninos domésticos acometidos por otite foram comprovados por Bobany *et al.* (2010).

Diante do elevado número de substâncias de interesse na sua composição e seguindo as tendências atuais de consumo de produtos de origem natural com propriedades de prevenção de doenças, além do seu papel nutricional, houve um aumento no interesse do mel (Iurlina *et al.*, 2009). Essas propriedades preventivas estão associadas à presença da classe de moléculas a exemplo de ácidos fenólicos, flavonóides, vitaminas e compostos fitoquímicos que têm propriedades antioxidantes. O mel é utilizado como uma fonte de antioxidantes naturais que são efetivos na diminuição dos riscos de doenças cardíacas, câncer, deficiência do sistema imune, catarata e processos inflamatórios diversos (The National Honey Board, 2003). Dentre os flavonóides, verifica-se a crisina, a pinocembrina, a pinobanksina, a quercetina, o caempferol, a luteolina, a galangina, a apigenina, a hesperetina e a mirecetina. Os ácidos fenólicos caféico, cumárico, ferúlico, elágico e clorogênico, carotenóides, ácido ascórbico, enzimas catalase e peroxidase e os produtos da reação de Maillard (Bertoncelj *et al.*, 2007). A quantidade destes varia amplamente de acordo com as origens florais e geográficas. As condições de processamento, manipulação e armazenamento possuem caráter minoritário em termos de influência sobre a composição dos antioxidantes presentes no mel (Gheldof, Wang e Engeseth, 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAMI, B.; BENNETT, J. L.; KRIEGER, C.; TETZLAFF, W.; ROSSI, F. M. V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. **Nat Neurosci.**, v. 10, p. 1538-1543, 2007.

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

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

ALMERIA, S.; FERRER, D.; PABÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Vet Parasitol.**, v.107, p. 287-294, 2002.

ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. Características Físico-Químicas de Amostras de Mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 644-650, 2005.

AL-WAILI, N. S. Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood levels of minerals and enzymes in normal individuals. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 2, p. 135-140, 2003.

AL-WAILI, N. S.; BONI, N. S. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 2, p. 129-133, 2003.

AL-WAILI, N. S. e HAQ, A. Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. **Journal of Medicinal Food**, v. 7 n.4, p. 491-494, 2004.

AMMANN, P.; WALDVOGEL, A.; BREYER, I.; ESPÓSITO, M.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B. The role of B- and T-cell immunity in toltrazuril-treated C57BL/6 WT, μ MT and nude mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Parasitology Research.**, v. 93, n. 3, p. 178–187, 2004.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 417-431, 2000.

ANDRE, M. R., ADANIA, C. H., TEIXEIRA, R. H. F., SILVA, K. F., JUSI, M. M. G., MACHADO, S. T. Z., DE BORTOLLI, C. P., FALCADE, M., SOUSA, L., ALEGRETTI, S. M., FELIPPE, P. A. N., MACHADO, R. Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. **J. Parasitol.**, v. 96, p. 1007–1009, 2010.

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; PAIVA, F. **Diagnóstico e Controle da Neosporose em bovinos**. Documento 136, EMBRAPA, nov, 2003. 51p. ISSN 1517-3747.

ANSORGE, S.; REINHOLD, D.; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. **Z Naturforsch.**, v. 58c, p. 580-589, 2003.

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

ARNAUD, A. F.; DA SILVA, R. A.; ARAÚJO, L. L. S.; JÚNIOR, R. J. S.; JÚNIOR, D. A. O. Perfil Sensorial de Méis de *Apis mellifera* L., 1758 (*Hymenoptera, Apidae*) Produzidos na Microrregião de Catolé do Rocha – PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 3, n. 4, p. 73-85, 2008.

AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; DE SOUZA, S. R.; DUTRA, V. M. L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chem.**, v. 80, p. 249-254, 2003.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L. REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A. Congenital Neospora infection in calves from cows that had previously aborted Neospora-infected fetuses: four cases. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 202, n. 1, p. 113-117, 1993.

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

BARRES, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron Perspective**, v. 60, p. 430-440, 2008.

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

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

BAUMANN, N.; PHAN-DINH, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian Central Nervous system. **Physiol Review**, v. 81, n. 2, p. 871-910, 2001.

BENVENISTE, E. N. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. **Chem immunol.**, v. 52, p. 106-153, 1992.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Propriedades Físico-Químicas de Amostras Comerciais de Mel com Própolis do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 49-52, 2007.

BERGER, S.; SAVITZ, S. Deleterious role of THF- α in retinal ischemia-reperfusion injury. **IOVS**, v. 49, n. 8, p. 3605-3610, 2008.

BERTONCELJ, J.; DOBERSEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the Phenolic Content, Antioxidant Activity and Colour of Slovenian Honey. **Food Chemistry**, v.105, p. 822-828, 2007.

BIELSA, J. M.; ROMERO, J. J.; HEUER, C. Controle de Neosporose em bovinos com Bovilis Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, 2004.

BIGNANI, A. Discussion in Neuroscience. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, v. 8, p. 1-45, 1991.

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

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

BJERKAS, I.; PRESTHUS, J. The neuropathology in toxoplasmosis like infection caused by a newly recognized cist forming sporozoon in dogs. **Acta Pathologica, Microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 97, n. 5, p. 459-468, 1989.

BJORKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. Neospora species infection in a herd of dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 208, n. 9, p. 1441-1444, 1996.

BOBANY, D. M.; PIMENTEL, M. A. P.; MARTINS, R. R. C.; NETTO, B. E. de S.; TOLLA, M. S. de. 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, v. 11, n. 2, p. 441-446, 2010.

BOGDANOV, S. Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, n. 7, p. 748-753, 1997.

BOYSEN, P.; KLEVAR, S.; OLSEN, I.; STORSET, A. K. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 953-960, 2006.

BRAKE, D. A. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 509-515, 2002.

BREDDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu Ver Biochem.**, v. 63, p. 175-195, 1994.

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. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitology Research**, v. 100, p. 281-285, 2007.

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

BROWN, G. C.; BOLAÑOS, J. P.; SIMON, J. R.; HEALES, S. J. R.; CLARK, J. B. Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. **Neurosci Letters**, v. 193, p. 201-204, 1995.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitol.**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

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

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. Classificação do Mel em Floral ou Mel de Melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 1-5, 2003.

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

CHRISTOPHERSON, K. S.; ULLIAN, E. M.; STOKES, C. C. A.; MULLOWNEY, C. E.; HELL, J. W.; AGAH, A., *et al.* Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**, v. 120, p. 421-433, 2005.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SORJONEN, D. C.; DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 208-211, 1995.

CONRAD, P. A., BARR, B. C., SVERLOW, K. W., ANDERSON, M. L., DAFT, B., KINDE, H, DUBEY, J. P., MUNSON, L., ARDANS, A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. From aborted bovine fetuses. **Parasitol.**, v. 106, p. 239-249, 1993.

CONTI, R.; RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A. 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, v. 21, n. 148, p. 91-96, 2007.

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

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. 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, 1991.

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

DAMRIYASA, I. M.; BAUER, C.; EDELHOFER, R.; FAILING, K.; LIND, P.; PETERSEN, E.; SCHARES, G.; TENTER, A. M.; VOLMER, R.; ZAHNER, H. 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**, v. 126, p. 271-286, 2004.

DAVISON, H. C.; GUY, F.; TREES, A. J.; *et al.* In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. **Res. Vet Sci.**, v. 67: p. 103-105, 1999.

DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., LONDON, E. D., BRETT, D. S., SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc Natl Acad Sci.**, USA 88, p. 6368-6371, 1991.

DELMAS, C.; VIDON, D. J. M.; SEBALD, M. Survey of Honey for *Clostridium botulinum* Spores in Eastern France. **Food Microbiology**, v. 11, n. 6, 515-p. 518, 1994.

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

DICKSON, D. W.; LEE, S. C.; MATTIACE, L. A.; YEN, S. H.; BROSAN, C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. **Glia**, v. 7, p. 75-83, 1993.

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

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

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 161-169, 2003.

DOS SANTOS, C. R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. A.; ARAÚJO, G. L.; TEIXEIRA, L. A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 13 (Supl. 1), p. 71-74, 2003.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 193, n.10, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs **American Journal Veterinary Research**, v. 50, n. 9, p. 1578-1579, 1989.

DUBEY, J. P.; HIGGINS, R. J.; SMITH, J. H.; O'TOOLE, T. D. *Neospora caninum* encephalomyelitis in a British dog. **Veterinary Record**, v. 126, n. 8, p. 193-194, 1990.

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

DUBEY, J. P.; LIDDEL, S.; MATTSON, D.; SPEER C. A.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **J. Parasitol.**, v. 87, n. 2, p. 345-353, 2001.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHIL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSON, 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. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int J Parasitol.**, v. 32, p. 929-946, 2002.

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

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

DUSSE, L. M. S. A., VIEIRA, L. M., CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 15-36, 1993.

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

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

EPERON, S.; BRONNIMANN, K.; HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 225-236, 1999.

FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brian Res. Bull.**, v. 49, n. 6, p. 377-391, 1999.

FERROGLIO, E.; GUIISO, M.; PASINO, M.; ACOSSATO, A.; TRISCIUOGLIO, A. Antibodies to *Neospora caninum* in stray cats from North Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 31-34, 2005.

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. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 161-166, 2004a.

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

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

FREIRE, E.; GOMES, F. C. A.; JOTHA-MATTOS, T.; MOURA NETO, V.; SILVA FILHO, F. C.; COELHO-SAMPAIO, T.. Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices. **J Cell Sci.**, v. 117, n. 18, p. 4067-4076, 2004.

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

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

FUKUDA, M.; KOBAYASHI, K.; HIRONO, Y.; MIYAGAWA, M.; ISHIDA, T.; EJIOGU, E. C.; SAWAI M.; PINKERTON, K. E.; TAKEUCHI, M. Jungle Honey Enhances Immune Function and Antitumor Activity. **eCAM Advance**, v. 12, p. 1-8, 2009.

GARDEN, G. A.; MOLLER, T. Microglia biology in health and disease. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 1, p. 127-137, 2006.

GEE, J. R.; KELLER, J. N. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 1145-1150, 2005.

GEORGIEVA, D. A.; PRELEZOV, P. N.; KOINARSKI, V. T. *Neospora caninum* and neosporosis in animals - a review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, Bulgaria. v. 9, n. 1, p. 1-26, 2006.

GHELDOLF, N.; WANG, X-H.; ENGESETH, N. J.; Identification and Quantification of Antioxidant Components from Various Floral Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5870-5877, 2002.

GIMSA, U.; OREN, A.; PADIYAN, P.; TEICHMANN, D.; BECHMANN, I.; NITSCH, R.; BRUNNER-WEINZIERL, M. C. Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). **J Mol Méd.**, v. 82, n. 6, p. 364-372, 2004.

GOMES, F. C. A.; MAIA, C. G.; DE MENEZES, J. R. L.; NETO, V. M. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. **Glia**. V. 25, p. 247-255, 1999.

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

GONÇALVES, J.O.C. **Potencial modulatório do mel de Jataí (*Tetragonisca angustula*) em culturas de astrócitos de ratos infectadas *in vitro* com *Neospora caninum***. 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2011.

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

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

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 247-252, 2006.

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

GONDIM, L. S. Q.; ABE-SANDES, K.; UZEDA, R. S.; SILVA, M. S. A.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; GONDIM, L. F. P. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology** v. 168, p. 121-124, 2010.

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

HANISCH, U. K., KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci.**, v. 10, n. 11, p. 1387-1394, 2007.

HANSSON, E. Primare astroglial cultures: Aspects of morfology, biochemistry and transmitter metabolism. **Goteborg**, p. 1-61, 1982.

HASSIG, M.; SAGER, H.; REITT, K.; ZIEGLER, D.; STRABEL, D.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Vet Parasitol.**, v. 117, n. 3, p. 213-220, 2003.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 112, n. 2, p. 183-197, 1996.

HEMPHILL, A. The host – Parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, v. 43, p. 49-104, 1999.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* and neosporosis – recent achievements in host and parasite cell biology and treatment. **Acta Parasitologica**. Warszawa, Poland. v. 51, n. 1, p. 15-25, 2006.

HILALI, M.; LINDBERG, R.; WALLER, T.; WALLIN, B. Enigmatic cyst-forming sporozoon in the spinal cord of a dog. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 27, n. 4, p. 623-625, 1986.

HILALI, M.; ROMAND, S., THULLIEZ, P., KWOK, O. C. H., DUBEY, J. P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 75, p. 269-271, 1998.

HOLMDAHL, L., RISBERG, B., BECK, D.E. *et al.* Adhesions: pathogenesis and prevention-panel discussion and summary. **Eur J Surg Suppl**, v. 577, p. 56-62, 1997.

HOSNY, I. M.; EL-GHANI, S. A.; NADIR, A. S. Nutrient Composition and Microbiological Quality of Three Unifloral Honeys with Emphasis on Processing of Honey Probiotic Youghurt. **Global Veterinaria**, v. 3, n. 2, p. 107-112, 2009.

HUANG, C. C.; YANG, C. H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y. K.; OOI, H. K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Vet Res.**, v. 35, n. 3, p. 283-290, 2004.

HUNTER, C. A.; REINER, S. L. Cytokines and T cells in host defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 4, p. 413-418, 2000.

HURKOVA, L.; MODRY, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 1-2, p. 150-154, 2006.

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

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

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

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

IURLINA, M. O.; SAIZ, A. I.; FRITZ, R.; MANRIQUE, G. D. Major Flavonoids of Argentinean Honeys. Optimisation of the Extraction Method and Analysis of Their Content in Relationship to the Geographical Source of Honeys. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1141-1149, 2009.

JARDINE, J. E. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. **Vet Parasitol.**, v. 62, n. 3-4, p. 231-240, 1996.

JENKINS, M. C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R. D.; DYER, R.; DUBEY, J. P.. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Vet Parasitol.**, v. 143, p. 161-165, 2007.

JESSEN, K. R. Glial cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 1861-1867, 2004.

KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; FONSEKA, S.; KASPER, L. H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Exp Parasitol.**, v. 85, p. 24-34, 1997.

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

KIMELBERG, H. K. The problem of astrocyte identity. **Neurochem Int.**, v. 45, p. 191-202, 2004.

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

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

LA GRANGE, V.; SANDERS, S. W. Honey in Cereal-Based New Food Products. **American Association of Cereal Chemists**, v. 33, n. 10, p. 833-838, 1988.

LAWSON, L. J.; PERRY, V. H.; DRI, P.; GORDON, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151-170, 1990.

LEMBERGER, K. Y.; GONDIM, L. F. P.; PESSIER, A. P.; McALLISTER, M. M.; KINSEL, M. J. *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent Canine Distemper Virus infection. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 960-961, 2005.

LENT, R. Cem bilhoes de neuronios: Conceitos fundamentais de neurociências. SP: **Atheneu**, 2001. 95p.

LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. **Proc Natl Acad Sci., U S A.** v. 96, p. 7526-7531, 1999.

LIMA, F. R. S.; ARANTES, C. P.; MURAS, A. G.; NOMIZO, R.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem.**, v. 103, p. 2164-2176, 2007.

LIMA, F. R. S.; FONSECA, A. C. C.; FARIA, G. P.; DUBOIS, L. G. F.; ALVES, T. R.; AMARAL J. F.; MOURA NETO, V. Microglia and the neural development **In: Stem Cells: From tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy** ed.Dordrecht : Springer. 2009.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 327-333, 1999a.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.;DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999b.

LINDSAY, D. S.; RITTER, D. M.; BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. **J Parasitol.**, v. 87, n. 4, p. 909-911, 2001a.

LINDSAY, D. S.; WESTON, J. L.; LITTLE, S. E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Vet Parasitol.**, v. 97, n. 2, p. 159-164, 2001b.

LIPTON, S. A.; CHOI, Y. B.; PAN, Z. H.; LEI, S. Z.; CHEN, H. S. V.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, v. 364, p. 626-632, 1993.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in Southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VAN DER VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

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

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

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, n. 4, p. 7-9, 2005.

LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 5, p. 198-201, 2002.

MACALDOWIE, C.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **J. Comp Pathol.**, v. 131, n. 2-3, p. 142-156, 2004.

MALLAT, M.; MARÍN-TEVA, J. L.; CHÉRET, C. Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 15, p. 101-107, 2005.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I. P. Análise de Agrupamento, com Base na Composição Físico-química, de Amostras de Méis Produzidos por *Apis mellifera L.* no Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 8-17, 2005.

MARKS, J.; LUNDÉN, A.; HARKINS, D.; INNES, E. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4⁺ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 7, p. 303-309, 1998.

MASSON, B. **O Mel: o delicioso sabor de um alimento nutritivo**. São Paulo SP: Editora Gaia, 1994. 117p.

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

McGARRY, J. W.; STOCKTON, C. M.; WILLIAMS, D. J.; TREES, A. J. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. **J Parasitol.**, v. 89, n. 3, p. 628-630, 2003.

McGUIRE, A. M.; McALLISTER, M. M.; WILLS, R. A.; TRANAS, J. D. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1525-1529, 1999.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; MESQUITA, L. X.; MARACAJÁ, P. B. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, Caatinga (Mossoró, Brasil), v. 22, n. 2, p. 7-14, 2009.

MINEO, T. W. P.; MARCIANO, J. A.; CARRASCO, A. O. T.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Experimental infection of pigeons (*Columbia livia*) by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. In: 1o. SIMPÓSIO SOBRE NEOSPOORA CANINUM NO BRASIL, 2005, São Paulo, SP... Anais do 1º. Simpósio sobre *Neospora caninum* no Brasil. Jaboticabal, SP: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. 2005.

MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World** v. 73, n. 1, p. 5-28, 1992.

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

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

MULLER, N.; VONLAUFEN, N.; GIANINAZZI, C.; LEIB, S. L. ; HEMPHIL, A. Applicatio of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 252-255, 2002.

MURPHY, S.; SIMMONS, M. L.; AGULLÓ, L.; GARCIA, A.; FEINSTEIN, D. L.; GALEA, E.; REIS, D. J.; MINC-GOLOMB, D.; SCHWARTZ, J. P. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. **Trends Neurosci.**, v. 16, n. 8, p. 323-328, 1993.

NADARAJAH, S. The Kotz type distribution with applications. **Statistics**, v. 37, n. 4, p. 341-358, 2003.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, p. 3051-3064, 1992.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, p. 1314-1318, 2005.

NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. 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.**, v. 8, n. 4, p. 811-817, 2001.

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

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 447p.

NORENBERG, M. D. Astrocyte responses to CNS injury. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 53, n. 3, p. 213-220, 1994.

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, v. 7, n. 3, p. 159-165, 2007.

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

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

O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **The Veterinary Record.**, v. 121, n. 24, p. 563-566, 1987.

PARISH, S. M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T. E.; WEIDNER, J. P.; McELWAIN, T.; KNOWLES, D. P.; LEATHERS, C. W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 12, p. 1599-1600, 1987.

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

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. **The Neuroscientist**, v. 10, n. 1, p. 53-62, 2004.

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

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1144-1148, 2001a.

PETERS, M.; WOHLSEIN, P.; KNIERIEM, A.; SCHARES, G. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). **Vet Parasitol**, v. 97, n. 2, p. 153-157, 2001b.

PFRIEGER, F. W.; BARRES, B. A. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. **Science**, v. 277, p. 1684-1687, 1997.

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

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

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; RIBEIRO, C. S. O.; TARDY, M.; EL BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D. *Neospora caninum*: early immune response of

rat mixed glial cultures after tachyzoites infection. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 442-447, 2010.

PRAKASH, A.; MEDHI, B.; AVTI, P. K.; SAIKIA U. N.; PANDHI P.; KHANDUJA K. L. Effect of different doses of manuka Honey in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. **Phytotherapy research**, v. 22, p. 1511-1519, 2008.

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

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 478–482, 1997.

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

ROCK, R. B.; GEKKER, G.; HU, S.; SHENG, W. S.; CHEERAN, M.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P, K. Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev.**, v. 17, n. 4, p. 942-964, 2004.

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**, v. 82, p. 202-207, 2007.

SADREBAZZAZ, A.; HADDADZAREH, H.; SHAYAN, P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in camels (*camelus dromedarius*) in Mashhad, Iran. **Parasiology Research**, v. 98, n. 6, p. 600-601, 2006.

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

SANGSTER, C., BRYANT, B., CAMPBELL-WARD, M., KING, J. S., SLAPETA, J. Neosporosis in an aborted southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) fetus. **J. Zoo Wildlife Med.**, v. 41, p. 725–728, 2010.

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

SCHARES, G.; HEYDORN, A. O.; CUPPERS, A.; CONRATHS, F. J.; MEHLHORN, H. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. **Parasitology research**, v. 87, p. 873-877, 2001.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHRODER, R.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. p38-avidity-ELISA: Examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum* associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 293-305, 2002.

SEIFERT, G.; SCHILLING, K.; STEINHAUSER, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 94-206, 2006.

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

SHER, A.; COLLAZZO, C.; SCANGA, C.; JANKOVIC, D.; YAP, G.; ALIBERTI, J. Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunol. Res.**, v. 27, n. 2-3, p. 521-528, 2003.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. 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. 260-265, 2004.

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

SLAPETA, J. R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Vet Parasitol.**, v. 109, n. 3-4, p. 157-167, 2002.

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

SOLDATI, S.; KIUPEL, M.; WISE, A.; MAES, R.; BOTTERON, C.; ROBERT, N. Meningoencephalomyelitis caused by *Neospora caninum* in a juvenile fallow deer (*Dama dama*). **J Vet Med.**, .v. 51, n. 6, p. 280-283, 2004.

SOUZA, S. L. P. **Soroprevalência de anticorpos anti-Neospora caninum e Toxoplasma gondii em cães de propriedades rurais produtoras de leite B da Região Norte do Estado do Paraná.** p. 115. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

SOUZA, B. A. 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. p. 17-24, 2007.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; McALLISTER, M. M.; BLIXT, J. A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, .v. 29, n. 10, p. 1509-1519, 1999.

SPENCER, J. A.; HIGGINBOTHAM, M. J.; YOUNG-WHITE, R. R.; GUARINO, A. J.; BLAGBURN, B. L. *Neospora caninum*: adoptive transfer of immune lymphocytes precipitates disease in BALB/c mice. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 106, p. 329-333, 2005.

STASKA, L. M.; McGUIRE, T. C.; DAVIES, C. J.; LEWIN, H. A.; BASZLER, T. V. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes **Infect Immun.**, v. 71, n. 6, p. 3272-3279, 2003.

STIPURSKY, J; SPOHR, T. C. L. de S. e; SOUSA, V. O.; GOMES, F. C. A. Neuron–Astroglial Interactions in Cell-Fate Commitment and Maturation in the Central Nervous System. **Neurochem Res.**, Published on line: 22 mai 2012. 17p.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 563–581, 1999.

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

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

TEIXEIRA, W. C. **Prevalência de Anticorpos IgG Anti-*Neospora caninum* e Anti-*Toxoplasma gondii* Em Bovinos e Caninos das Mesoregiões Norte e Centro Maranhense, Maranhão, Brasil.** p. 122. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2008.

THE NATIONAL HONEY BOARD. **Honey and Antioxidants.** 2003. Disponível em: <<http://www.honey.com/consumers/honeyhealth/nutritionresearch/antioxidants.asp>>. Acesso em: 21 Set. 2011.

TONKS, A.; COOPER, R. A.; PRICE, A. J.; MOLAN, P. C.; JONES, K. P. Stimulation of TNF- α release in monocytes by honey. **Cytokine**, v. 14, n. 4, p. 240-242, 2001.

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

TONKS, A. J.; DUDLEY, E.; PORTER, N. G.; PARTON, J.; BRAZIER, J.; SMITH, E. L.; TONKS, A. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, p. 1147-1155, 2007.

TOVEY, F. I. Honey and Healing. *Journal of Royal Socoety of Medicine*, v. 84, n. 7, p. 447, 1991.

TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A., WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine Neosporosis. **Int. T. Parasi tol .**, v. 29, p. 1195–1200, 1999.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.

TUO, W.; FETTERER, R.; JENKINS, M.; DUBEY, J. P. Identification and characterization of *Neospora caninum* Cyclophilin that elicits Gamma Interferon production. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 5093-5100, 2005.

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

VENTERS, H. D.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. A new concept in neurodegeneration: TNF α is a silencer of survival signals. **Trends Neurosci.**, v. 23, n. 4, p. 175-180, 2000.

VIANNA, M. C. B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Vet Parasitol.**, v. 129, n. 3-4, p. 253-257, 2005.

VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 37, p. 17-21, 2005.

VINCENT, S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. **Prog Neurobiol.**, v. 42, p. 129-160, 1994.

VITALIANO, S. N.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and Midwestern regions of Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 122, n. 4, p. 253-260, 2004.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response. **Neuron Glia Biology**, p. 1-7, 2012.

WANG, L. C., BAIRD, D. H., HATTEN, M. E., MASON, C. A. Astroglial differentiation is required for support of neurite outgrowth. **J Neurosci.**, v. 14, n. 5, p. 3195-3207, 1994.

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

WESTON, R.J. The contribution of Catalase and Other Natural Products to the Antibacterial Activity of Honey: a review. **Food Chemistry**, v. 71, p. 235-239, 2000.

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; GUY, F.; McGARRY, J. W.; McKAY, J. S.; TREES, A. J. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. **Int J Parasitol.**, v. 33, n. 10, p. 1059-1065, 2003.

WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum* infected cattle. **Parasite Immunology.**, v. 28, n. 3, p. 61-67, 2006.

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

WON, J. S.; IM, Y. B.; SINGH, A. K.; SINGH, I. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. **Free Radic Biol Med.**, v. 37, n. 11, p. 1834-1844, 2004.

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

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

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

YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMIZU, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K.; YOKOMIZO, Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 347-351, 2000.

ZHOU, R.; ZHENG, SHEN-XI; TANG, W.; HE, PEI-LAN; LI, XIAO-YU; YANG, YI-FU; LI, YUAN-CHAO; GENG, JIAN-GUO; ZUO, JIAN-PING. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by (5R)-5-hydroxytryptolide in interferon- γ - and bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 316, p. 121-128, 2006.

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO DE OXÍDO NÍTRICO EM CULTURAS MISTAS DE RATOS INFECTADAS *IN VITRO* COM *Neospora caninum* E TRATADAS COM MEL DE JATAÍ (*Tetragonisca angustula*).

1. Artigo submetido ao comitê editorial da revista Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences

PRODUÇÃO DE OXÍDO NÍTRICO EM CULTURAS MISTAS DE RATOS INFECTADAS *IN VITRO* COM *Neospora caninum* E TRATADAS COM MEL DE JATAÍ (*Tetragonisca angustula*)

RESUMO: *Neospora caninum* é um parasito intracelular causador da neosporose, enfermidade que acomete várias espécies animais causando abortos e distúrbios neurológicos. Estudos recentes envolvendo o *N. caninum* demonstraram que as células gliais têm sido consideradas um modelo de infecção *in vitro* válido para este protozoário. As células da glia desempenham um importante papel na defesa do Sistema Nervoso Central. O mel tem sido utilizado desde a antiguidade pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas. O presente estudo objetivou avaliar, *in vitro*, a reatividade de células gliais (astrócitos e microglias) infectadas com *N. caninum* tratadas com 1% de mel de Jataí (*Tetragonisca angustula*). Culturas primárias mistas de astrócitos e microglias de ratos (*Rattus norvegicus*) foram tratadas com 1% de mel de Jataí (*Tetragonisca angustula*) a partir do 8º dia de cultivo. No 15º dia de cultivo as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum*, cepa NC-Bahia. Após 72h de infecção foram realizados testes a fim de verificar o metabolismo mitocondrial, a atividade da lactato desidrogenase (LDH), a produção de óxido nítrico (NO) e o número total de parasitos. Nas culturas tratadas com 1% de mel foram observadas elevações no metabolismo mitocondrial e na permeabilidade celular. Ocorreu aumento na produção de nitritos, possivelmente indicando ativação microglial. Os valores de NO encontrado nesse estudo podem representar o início de uma resposta imune contra os taquizoítos de *N. caninum*, uma vez que esse acréscimo pode contribuir para redução do número de taquizoítos. Desta forma sugere-se que o mel exerceu um efeito protetor sobre as culturas de astrócitos e microglias infectadas com *N. caninum*.

Palavras-chave: astrócitos, microglias, *neospora*, óxido nítrico, mel.

PRODUCTION OF NITRIC OXIDE IN RATS MIXED CULTURES INFECTED *IN VITRO* WITH *Neospora caninum* AND TREATED WITH JATAÍ (*Tetragonisca angustula*) HONEY

ABSTRACT: *Neospora caninum* is an intracellular parasite that causes neosporosis. This disease affects many species, causing abortions and neurologic disorders. Recently studies involving *N. caninum* demonstrated that glial cells have been considered a valid model of *in vitro* infection for this protozoan. Glial cells play important role in the protection of the central nervous system. Once honey has been used since ancient times to control infections and inflammatory reactions, the aim of this study was to evaluate the effects of 1% Jataí (*Tetragonisca angustula*) honey treatment in glial cells, infected *in vitro* with *N. caninum*. Astrocytes and microglia mixed cultures were treated with 1% of honey after eighth day in cell culture. On the day 15 cultures were infected with tachyzoites of *N. caninum*. After 72 hours of infection, mitochondrial metabolism, lactate dehydrogenase activity (LDH), production of nitric oxide (NO) and total number of parasites were studied in cultures. Treatment with 1% honey had an increase of mitochondrial metabolism, cell permeability, and in the levels of nitric oxide. Cultures with an increase in the nitrite production can indicate microglial activation. The NO values found in this study, could represent a beginning of an immune response against the tachyzoites of *N. caninum*, since this could reduce the number of tachyzoites. Thus it is suggested that honey exerted a protective effect on the cultures of astrocytes and microglia infected with *N. caninum*.

Key-words: astrocytes, microglia, neosporosis, nitric oxide, honey.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório que causa a neosporose, uma das principais doenças reprodutivas de bovinos. Essa enfermidade é considerada como uma importante causa de abortamento em rebanhos leiteiros e de corte, levando a grandes perdas econômicas na pecuária (Dubey, 2003), além de provocar alterações neuromusculares em cães (Dubey e Lindsay, 1996; Gondim, 2006).

O sistema nervoso central (SNC) é uma estrutura complexa e heterogênea com dois tipos celulares, divididos em neurônios e células gliais. As células gliais (neuroglia), dividem-se em macroglia (oligodendrócitos e astrócitos); microglia e as células endoteliais. Os astrócitos e as microglias são as duas principais populações de células reativas a danos neuronais e as alterações no microambiente cerebral. Culturas de células gliais e particularmente culturas mistas de astrócitos/microglia, constituem um modelo válido para o estudo da fisiopatologia do SNC (Streit, Walter e Pennell, 1999; Costa *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008), permitindo uma melhor compreensão das interações dessas células com o *N. caninum*. (Pinheiro *et al.*, 2006, Pinheiro *et al.*, 2010; Matos, 2010).

Devido à necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos várias pesquisas têm sido realizadas utilizando produtos naturais, de origem vegetal ou animal, visando à detecção e caracterização de compostos químicos com propriedades terapêuticas (Gonçalves, Alves Filho e Menezes, 2005). O mel de abelha é considerado uma fonte natural de saúde devido às suas qualidades terapêuticas (Silva, Queiroz e Figueiredo, 2004).

O mel apresenta em sua composição uma mistura complexa de carboidratos, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e sais minerais (Mendes *et al.*, 2009). Além de ser um alimento, é também utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos, pela sua ação antiinflamatória, atividade antimicrobiana e outras conhecidas funções terapêuticas a exemplo das antioxidantes e prebióticas (Hosny *et al.*, 2009).

Gonçalves, Alves Filho e Menezes, (2005) observaram com sucesso a atividade antimicrobiana *in vitro* do mel da abelha indígena *Nannotrigona testaceicornis*, pertencentes à tribo Trigoni, a mesma das abelhas jataí, frente a diferentes microorganismos isolados de focos infecciosos. Bobany *et al.*, (2010)

1 comprovaram a eficácia do mel de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) em
2 cultivo misto de bacilos, cocos e leveduras, encontrados no conduto auditivo de
3 caninos domésticos acometidos por otite. Esses resultados revelaram uma ação
4 do mel contra o *Staphilococcus sp.*, *Bacillus sp.* e leveduras. Tanto o mel como
5 outros produtos das abelhas, estimulam a produção de citocinas inflamatórias,
6 regulando o crescimento de linfócitos, suprimindo as citocinas pró-inflamatórias e
7 induzindo os linfócitos T reguladores derivados de TGF- β (Sakaguchi, 2000). O
8 objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos tóxicos em culturas mistas de
9 astrócitos/microglias de ratos neonatos, infectados *in vitro* com *N. caninum* frente
10 ao tratamento com mel de *Tetragonisca angustula*.

11

12

MATERIAL E MÉTODOS

13

14 **Cultura de células da glia:** Córtex de ratos Wistar neonatos (*Rattus*
15 *novergicus*) com até 48 horas de vida, foram utilizados para obtenção das células
16 da glia. O córtex foi dissociado mecanicamente e filtrado em membrana de nylon
17 de 80 μ m. O filtrado foi contado em hemacitômetro e distribuído em placas de 12
18 poços (TPP, Switzerland), contendo 3,5 x 10⁵ células por poço. As culturas
19 celulares foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro
20 fetal bovino (Cultilab, Brasil), 1mM de ácido pirúvico (SIGMA) e 2mM de glutamina
21 (SIGMA), em estufa a 37°C com atmosfera úmida a 5% de CO₂ por 15 dias, com
22 trocas regulares de meio a cada 48 horas (Costa *et al.*, 2002). Após 8 dias de
23 cultivo, o meio foi suplementado com o 1% de mel de *Tetragonisca Angustula*.

24

25 **Obtenção do mel de *T. Angustula*:** O mel foi obtido no setor de apicultura
26 (INSECTA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). A coleta foi
27 realizada dos favos presentes no interior da colônia, com auxílio de uma seringa
28 descartável, sendo transportado sob refrigeração até o laboratório. O mel foi
29 filtrado com filtro 0,22 μ m e diluído ao meio RPMI, sendo utilizado a partir do 8^o dia
de cultivo quando havia a formação de uma monocamada celular.

30

31 **Cultura de *N. caninum*:** Taquizoítos da cepa NC-Bahia (Gondim *et al.*,
32 2001) foram mantidas em células Vero, com mudanças regulares de meio RPMI,
suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino a cada 48 horas.

33

34 **Infecção das culturas:** As células gliais foram infectadas como descrito
por Pinheiro *et al.* (2006). De forma breve, no 15^o dia de cultivo, os parasitos

1 foram purificados utilizando filtro de 5 µm (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda), e
2 contados em hemacitômetro. Utilizou-se uma relação célula/parasito de 1:1, para
3 infecção das culturas. O período de contato com o *N. caninum* nas células foi de
4 72h e após esse período os parasitos de cada poço foram contados na câmara de
5 Neubauer.

7 **Efeitos tóxicos induzidos pela infecção:**

8 **MTT** - O método de conversão do MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-
9 2H tetrazolato de bromo] em cristais de formazan (Carmichael *et al.*, 1987)
10 baseia-se na redução do sal tetrazolato em consequência da atividade de
11 enzimas dehidrogenases mitocondriais resultando em uma reação de cor
12 púrpura. Para o método de conversão do MTT em formazan foram adicionados
13 0,5 g/L de MTT (Amresco[®], Solon, Ohio) às culturas, 2 horas antes do término do
14 período de infecção. O meio foi removido e a concentração dos cristais de
15 formazan dissolvidos em dimethyl sulfóxido (DMSO), permanecendo por 24h em
16 estufa à 37°C. Após esse período as culturas foram quantificadas a 580nm
17 utilizando um espectrofotometro (FEMTO 700 plus). Os resultados foram obtidos
18 em triplicata de 3 diferentes culturas e expressos em porcentagem de MTT
19 metabolizado.

20 **LDH** - A atividade da lactato desidrogenase, (LDH) que é um marcador
21 biológico enzimático estável e sua concentração, se correlaciona linearmente com
22 a estabilidade de membrana (Pinheiro *et al.*, 2006). Após 72 h da infecção com *N.*
23 *caninum*, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a atividade da LDH foi
24 determinada com o auxílio de kits comerciais (Doles, Brasil), de acordo com as
25 instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos em quadruplicata de 3
26 diferentes culturas e expressos em porcentagem de LDH.

27 **Dosagem de óxido nítrico:** A produção de óxido nítrico (NO) foi
28 determinada de acordo com o método de Griess (Won *et al.*, 2004), que quantifica
29 os nitritos (NO₂) acumulados nos sobrenadantes de culturas celulares como
30 marcador para a produção de óxido nítrico (NO). Utilizou-se 50µL dos
31 sobrenadantes das culturas que foram adicionados com igual volume 1:1 (v / v)
32 em uma mistura de 1% sulfanilamida, 5% de ácido fosfórico e 0,1% N-
33 etilenodiamina (1-naftil). A leitura foi realizada a 490 nm usando um leitor de
34 microplacas Universal Elx 800 (Biotek, Inc, EUA). Os resultados foram obtidos em

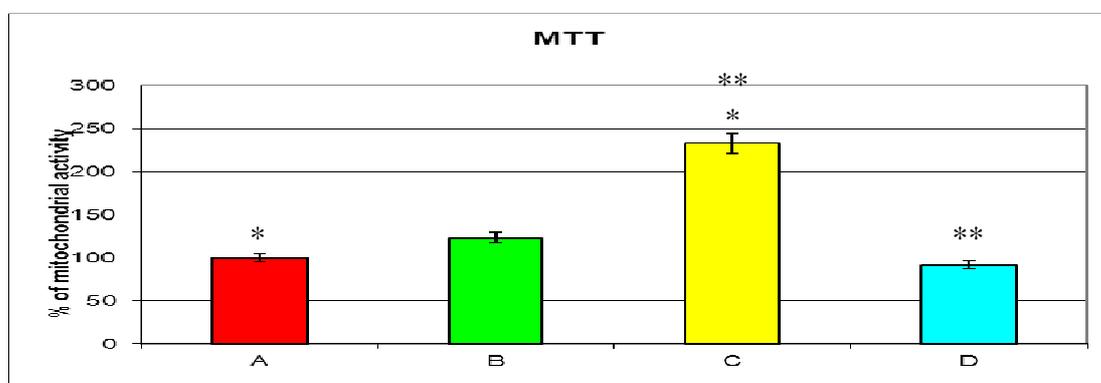
1 quadruplicata de 3 diferentes culturas e as curvas padrões foram geradas em
2 diluições seriadas do nitrito de sódio em meio de cultura.

3 **Dosagem de Proteínas:** O teor de proteína das culturas foi determinado
4 pelo método de Lowry *et al.* (1951) (Bio-Rad, Hercules, CA). As células foram
5 lavadas duas vezes com PBS, colhidas e lisadas em 2% (v / v) SDS, 2mM EGTA,
6 4M de uréia, 0,5% (v / v) de Triton X-100, 62.5mm de Tris -HCl (pH 6,8)
7 suplementado com 0,1% (v / v) de um coquetel de inibidores de protease (Sigma,
8 St. Louis, MO). A leitura foi realizada em uma absorbância de 630 nm usando um
9 leitor de microplacas Universal Elx 800 (Biotek, Inc, EUA). Os resultados foram
10 expressos em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

11 **Análise Estatística:** Os resultados foram expressos com média \pm desvio
12 padrão (SD). Para as comparações entre os grupos foi utilizado o teste t Student,
13 onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (Banzanatto e Kronka,
14 1992).

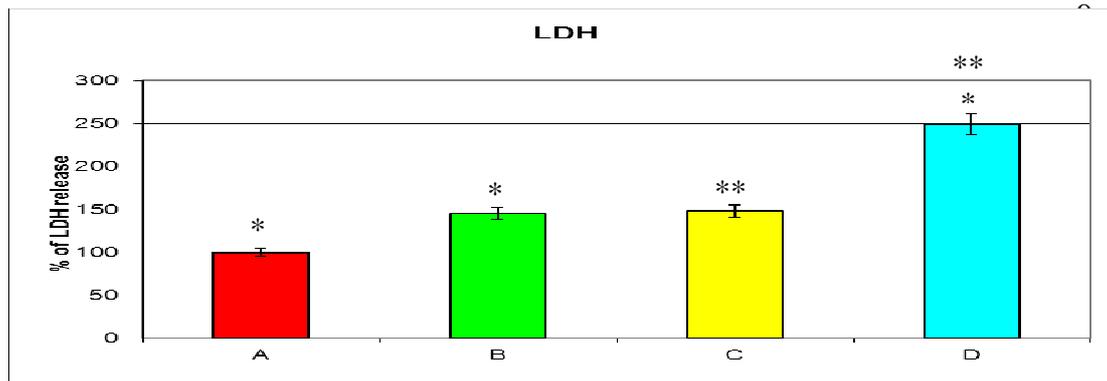
16 RESULTADOS

17
18 **Efeito induzido pela infecção:** Para verificar o metabolismo mitocondrial
19 utilizou-se o método colorimétrico quantitativo do MTT. As culturas tratadas
20 apenas com mel não apresentaram diferença do metabolismo mitocrondrial, já as
21 culturas infectadas com *N. caninum* apresentaram um aumento no metabolismo
22 mitocondrial quando comparadas com as culturas controle. As culturas que foram
23 tratadas com mel e infectadas com *N. caninum* apresentaram redução do
24 metabolismo mitocondrial, quando comparadas com as culturas apenas
25 infectadas com *N. caninum* (Fig. 1).



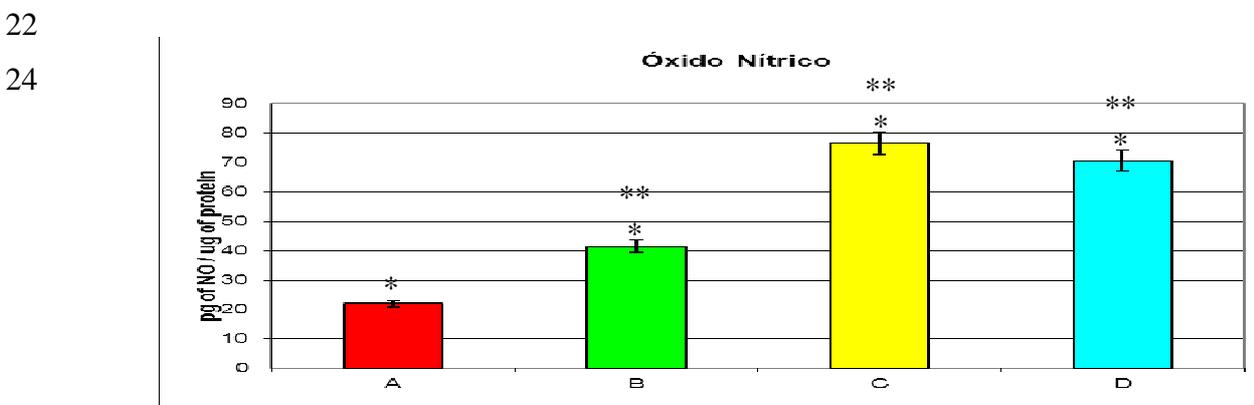
38 Figura 1 – Dosagem de MTT nas culturas de células mistas. A - controle, B – culturas
39 tratadas com 1% de mel, C – culturas infectadas com *N. caninum* e D – culturas tratadas com 1%
40 de mel e infectadas com *N. caninum*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$.

1 A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi utilizada como um indicador
2 da integridade da membrana celular, avaliando a sua permeabilidade após
3 exposição ao tratamento, bem como, sua citotoxicidade. As culturas tratadas com
4 mel e as culturas infectadas com *N. caninum*, apresentaram um aumento de cerca
5 de 50 % em relação às culturas controle. As culturas tratadas com mel e
6 infectadas com *N. caninum* apresentaram um aumento de cerca de 100% em
7 relação às culturas infectadas apenas com *N. caninum* (Fig. 2).



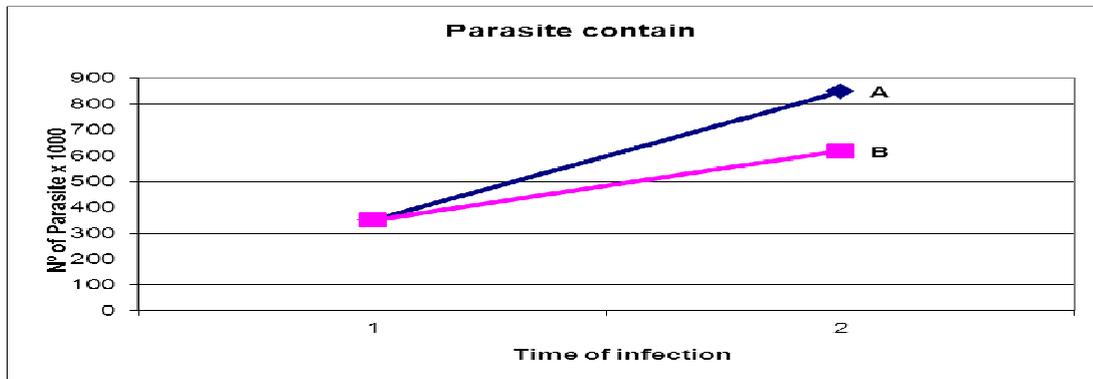
10 Figura 2 – Atividade da lactato desidrogenase no sobrenadante das culturas de células
11 mistas. A - controle; B - células tratadas com 1% de mel; C - culturas infectadas com *N. caninum* e
12 D - culturas tratadas com 1% de mel e infectadas com *N. caninum*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$.
13

14 **Produção de óxido nítrico:** A quantificação dos nitritos (NO_2) acumulados
15 nos sobrenadantes de culturas celulares foi utilizada como marcador para a
16 produção de óxido nítrico (NO). As culturas tratadas com mel apresentaram
17 aumento de cerca de 100% na produção de NO. Houve um aumento significativo
18 da produção de NO, nas culturas infectadas com *N. caninum* quando comparadas
19 com o grupo controle, o mesmo foi observado nas culturas tratadas com 1% de
20 mel e infectadas com *N. caninum* (Fig. 3).



25 Figura 3 – Produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas. A - controle, B - meio
26 com 1% do mel, C - meio infectado com *N. caninum* e D - meio tratado com 1% do mel e infectado
27 com *N. caninum*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$.

1
2 **Contagem do parasito:** Após 72h da infecção, as culturas com *N.*
3 *caninum* não apresentaram diferença significativa (847×10^3 taq/ml) no número
4 total de taquizoítos, quando comparadas as culturas infectadas com *N. caninum* e
5 tratadas com 1% de mel de *T. angustula* (617×10^3 taq/ml) (Fig. 4).



22 Figura 4 – Total de taquizoítos utilizados na infecção (1) e 72h após a infecção (2), A -
23 culturas infectadas com *N. caninum*; B - culturas infectadas com *N. caninum* e tratadas com 1% de
24 mel.
25

26 DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

27

28 Entre os principais tipos celulares do SNC, astrócitos e células microgliais
29 desempenham um papel importante na homeostase do cérebro, na
30 desintoxicação, neuroproteção, e resposta imune contra substâncias tóxicas,
31 infecções ou traumas (Coyle e Schwarcz, 2000). Nesse trabalho essas duas
32 células cultivadas *in vitro*, apresentaram alta atividade de LDH e aumento da
33 liberação de NO, além de redução do metabolismo mitocondrial após tratamento
34 com mel de *Tetragonisca angustula* e infecção com taquizoítos de *Neospora*
35 *caninum*. (Streit, Walter e Pennell, 1999; Costa *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008;
36 Pinheiro *et al.*, 2010; Matos, 2010).

37 A clivagem do anel do tetrazólio em MTT envolve a succinato
38 desidrogenase mitocondrial e depende da atividade da cadeia respiratória e do
39 estado redox das mitocôndrias. As culturas tratadas com mel não apresentaram
40 um aumento do metabolismo mitocondrial. O mel é um composto rico em
41 carboidratos, constituído de diferentes açúcares, além de diversas substâncias
42 como os flavonóides (Mendes *et al.*, 2009), podendo influenciar diretamente no
43 aumento da estabilidade das membranas, isso pode ter ocorrido devido ao
44 aumento na disponibilidade energética proveniente desses carboidratos. Visto que

1 o MTT pode sofrer alterações de alguns flavonoides (Peng *et al.*, 2005), essa
2 pode ter sido a razão para a manutenção do metabolismo mitocondrial das
3 culturas tratadas com mel. Entretanto resultados contrários foram descritos por
4 Gonçalves *et al.*, 2011 utilizando mel em culturas de astrócitos e por Matos, 2010
5 utilizando flavonóides em culturas de células gliais.

6 No presente estudo houve um aumento significativo do metabolismo
7 mitocondrial quando as culturas foram infectadas com *N. caninum*. Parasitos
8 coccídeos são capazes de estimular uma resposta imune celular e humoral (Tuo
9 *et al.*, 2005). Esse aumento provavelmente pode ser atribuído à multiplicação das
10 microglias ou a um aumento compensatório por conta da infecção. Pouco se
11 conhece sobre as interações entre astrócitos e microglias, mas sabe-se que
12 astrócitos influenciam algumas atividades da microglia e vice-versa,
13 principalmente no que se refere à liberação de substâncias (Silva *et al.*, 2008). A
14 microglia pode promover ou comprometer a viabilidade neuronal, dependendo do
15 seu nível de ativação; em lesões leves pode ser benéfica, como a reorganização
16 sináptica, e em situações severas ou crônicas, podem contribuir para mecanismos
17 neurotóxicos (Streit, Walter e Pennell, 1999).

18 Houve uma redução significativa no MTT das culturas infectadas e tratadas
19 com mel. Isso pode ter ocorrido devido a comunicação existente entre astrócitos e
20 microglias, fazendo com que as células infectadas desencadeassem,
21 possivelmente, um processo apoptótico. Fato semelhante é observado em
22 neurônios durante a neurogênese, quando as microglias contribuem para
23 apoptose dos neurônios progenitores (Wake, Moorhouse e Nabekura, 2012).

24 A atividade de LDH no meio de cultura foi utilizada para investigar a
25 existência de lesões de membranas *in vitro*. Nas culturas tratadas com mel
26 observou-se um aumento da atividade de LDH, resultados semelhantes aos
27 encontrados por Silva *et al.*, 2007 e Silva *et al.*, 2008, em culturas de astrócitos e
28 de células mistas respectivamente, após adição de flavonoides. Desta forma, os
29 flavonoides presentes no mel podem agir fragilizando as membranas plasmáticas
30 ou esse aumento pode ser resultado de uma disponibilidade dessa enzima no
31 interior celular pelo alto teor de carboidratos do mel.

32 Nas culturas infectadas e tratadas com mel o aumento da atividade da LDH
33 no meio de cultura, corrobora os achados do MTT. Uma vez que a lesão das
34 membranas podem ser um indicativo de morte celular.

1 O aumento da produção de NO após a administração do mel, tem sido
2 relatada na literatura. O mel de Meliponinae aumenta a concentração de NO na
3 saliva de humanos e sua administração intravenosa e intrapulmonar promove
4 melhoria das funções renal e hepática, além de estimular a atividade da medula
5 óssea e do perfil lipídico (Al Waili e Boni, 2003). Entretanto, Han *et al.*, (2007),
6 avaliaram a efeito do mel na produção de NO e fator de necrose tumoral em
7 células gliais e observaram que o mel inibe a produção de TNF- α e que esta
8 inibição está estreitamente associada com a supressão de NO, podendo ser um
9 poderoso regulador da inflamação e um potencial agente terapêutico contra uma
10 série de doenças.

11 As culturas de células tratadas com o mel de *T. angustula*, as infectadas
12 com *N. caninum* e as tratadas com mel e infectadas com *N. caninum*, induziram a
13 um aumento na produção de nitrito, possivelmente indicando ativação microglial.
14 Esses resultados foram também encontrados por Pinheiro *et al.*, 2006, 24 horas
15 após a infecção com *N. caninum* em astrócitos e em 2010, esses autores
16 encontraram em culturas mistas, aumento de NO, 24 e 72 horas após a infecção;
17 o mesmo pôde ser observado por Silva *et al.*, 2007 em culturas de astrócitos e por
18 Silva *et al.*, 2008 em culturas mistas, ambas tratadas com flavonóides. Com um
19 tratamento semelhante ao desenvolvido nesse estudo, entretanto utilizando
20 apenas astrócitos, Gonçalves, 2011, observou aumento significativo de NO nas
21 culturas tratadas com mel de *T. angustula*.

22 Os valores de NO encontrado neste estudo podem representar o início de
23 uma resposta imune contra os taquizoítos de *N. caninum*, uma vez que o NO
24 reduz o número de taquizoítos em cultura de cérebro de bovino (Yamane et al.,
25 2000). Este fato talvez se deva a presença dos flavonóides existentes no mel que
26 promovem efeito modulador na inflamação (Tonks et al., 2003), ativando as
27 microglias.

28 Diante do exposto os resultados nos levam a concluir que o mel de *T.*
29 *angustula* apresentou elevação na produção de NO das culturas tratadas com mel
30 e infectadas com taquizoítos de *N. Caninum*, sugerindo um efeito protetor sobre
31 as culturas de astrócitos e microglias infectadas com *N. caninum*.

32

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-WAILI, N.S.; BONI, N.S. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 2, p. 129-133, 2003.

BOBANY, D.M.; PIMENTEL, M.A.P.; MARTINS, R.R.C.; NETTO, B.E. de S.; TOLLA, M.S. de. 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, v. 11, n. 2, p. 441-446, 2010.

BANZATTO, D.V.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, p. 247, 1992.

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

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

COYLE, J.T.; SCHWARCZ, R. Mindglue: implications of glial cell biology for psychiatry. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 1, p. 90-93, 2000.

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

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

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

GONÇALVES, J.O.C. **Potencial modulatório do mel de Jataí (*Tetragonisca angustula*) em culturas de astrócitos de ratos infectadas *in vitro* com**

Neospora caninum. 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2011.

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

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 247-252, 2006.

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

HOSNY, I.M.; EL-GHANI, S.A.; NADIR, A.S. Nutrient Composition and Microbiological Quality of Three Unifloral Honeys with Emphasis on Processing of Honey Probiotic Youghurt. **Global Veterinaria**, v. 3, n. 2, p. 107-112, 2009.

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

MATOS, R.B. de. **Ação de flavonóides na potencialização da resposta das células gliais à infecção por *Neospora Caninum***. 2010. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos)-Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2010.

MENDES, C.G.; SILVA, J.B. A.; MESQUITA, L.X.; MARACAJÁ, P.B. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, Caatinga (Mossoró, Brasil), v. 22, n. 2, p. 7-14, 2009.

PENG, L.; WANG, B.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 45, p. 108-11, 2005.

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

PINHEIRO, A.M.; COSTA, S.L.; FREIRE, S.M.; RIBEIRO, C.S.O.; TARDY, M.; EL BACHÁ, R.S.; COSTA, M.F.D. *Neospora caninum*: early immune response of rat mixed glial cultures after tachyzoites infection. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 442-447, 2010.

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

SILVA, C.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F. 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. 260-265, 2004.

SILVA, A.M.M.; SILVA, A.R.; PINHEIRO, A.M.; et al. Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production. **Toxicol**, v. 49, p. 601-614, 2007.

SILVA, A.R.; PINHEIRO, A.M.; SOUZA, C.S.; FREITAS, S.R.V.B.; VASCONCELLOS, V.; FREIRE, S.M.; VELOZO, E.S.; TARDY, M.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M.F.D.; COSTA, S.L. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. **Cell Biol Toxicol.**, v. 24, p. 75–86, 2008.

STREIT, W.J.; WALTER, S.A.; PENNELL, N.A. Reactive microgliosis. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 563–581, 1999.

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

TUO, W.; FETTERER, R.; JENKINS, M.; DUBEY, J.P. Identification and characterization of *Neospora caninum* Cyclophilin that elicits Gamma Interferon production. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, 5093-5100, 2005.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response. **Neuron Glia Biology**, p. 1-7, 2012.

WON, J.S.; IM, Y.B.; SINGH, A.K.; SINGH, I. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. **Free Radic Biol Med.**, v. 37, n. 11, p. 1834-1844, 2004.

YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMIZU, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K.; YOKOMIZO, Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 347-351, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mel de *Tetragonisca angustula* promoveu um aumento na produção de óxido nítrico (NO), o que pode sugerir um efeito protetor sobre as culturas de astrócitos e microglias infectadas com *N. caninum*.

Esse estudo nos leva a considerar a possibilidade de utilização do mel como alternativa de tratamento contra a infecção por *N. caninum*.

Entretanto, novos trabalhos precisam ser realizados, visando o conhecimento dos aspectos que envolvem essa parasitose e sua interação com o sistema nervoso central.