



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

CLEUZA SANTOS ALMEIDA

**REDUÇÃO DO NÚMERO DE TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum*
EM CULTURAS DE CÉLULAS DA GLIA DE RATOS INFECTADOS *in vitro*, E TRATADOS COM FRAÇÃO DO MEL DE ABELHA
*Tetragonisca angustula***

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
DEZEMBRO – 2019**

CLEUZA SANTOS ALMEIDA

**REDUÇÃO DO NÚMERO DE TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum*
EM CULTURAS DE CÉLULAS DA GLIA DE RATOS INFECTADOS *in vitro*, E TRATADOS COM FRAÇÃO DO MEL DE ABELHA
*Tetragonisca angustula***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado do curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes
Pinheiro

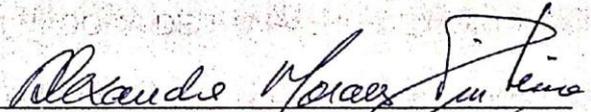
**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
DEZEMBRO – 2019**

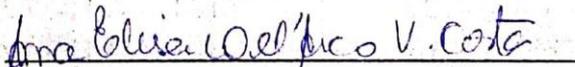
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

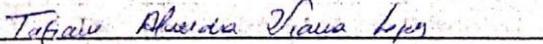
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CLEUZA SANTOS ALMEIDA

REDUÇÃO DO NÚMERO DE TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum* EM
CULTURAS DE CÉLULAS DA GLIA DE RATOS INFECTADOS *in vitro*, E TRATADOS
COM FRAÇÃO DO MEL DE ABELHA *Tetragonisca angustula*


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


Msc. Ana Elisa Del'Arco Vinhas Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


Msc. Tatiane Almeida Viana Lopes
Universidade Federal da Bahia

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo apoio e amor incondicional, estando sempre ao meu lado em todos os passos da minha caminhada. Dedico.

EPÍGRAFE

“Lâmpada para os meus pés é tua palavra e luz para o meu caminho.”

Salmos 119:105

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu Senhor Deus, pelo dom da vida, força e coragem para concretização não apenas de um trabalho, mas na realização de um sonho.

Aos meus preciosos pais Olava e Antonio, por todo amor, incentivo e parceria, obrigada por estarem sempre presente em minha vida.

Aos meus queridos irmãos Isabel, Erivaldo e Ismael, que são os meus melhores amigos desde sempre.

Ao meu Amor Danilo, pelo carinho e amor, pela compreensão, paciência, dedicação e companheirismo.

Aos meus sobrinhos Júnior e Levi que encanta os meus dias.

Ao meu sobrinho mais velho Alef, dono de uma alegria contagiante, que faz todo e qualquer momento divertido.

As minhas irmãs de vida, as que são mais que sobrinhas e sim amigas. Delma e Aline, obrigada pela atenção, conselhos, compreensão, e por acreditarem em mim, sou feliz por vocês participarem da minha vida.

A Adriel, meu baby, que nem é mas tão baby assim, meu pocinho de amor, que transbordando fofura me ensinou que é possível amar além do que se pode imaginar, meu filhinho do coração.

Aos animais, em especial aos cavalos, que despertaram em mim o desejo de seguir essa profissão e que desde sempre são os meus companheiros e a minha grande paixão.

As colegas do Laboratório de Imunologia e Bioquímica Veterinária – UFRB minha gratidão a, Ana Clara, Brenda Valério, a Pró Ana Elisa, Carol Primo, Keila Patrícia e Cíntia Santana.

As minhas amigas que se tornaram mais que parceiras de laboratório, Ângela Lima, Luciana Freitas e Tatiane Viana, sou grata pelo companheirismo, ajuda, os apoios diários e todos os ensinamentos, muito obrigada.

Ainda a Ângela Lima agradeço pela confiança, incentivo e ajuda, sem as quais seriam impossível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Bloco “N 5” Marcel, Danilo, Núbia, Bruno e Derlon, sempre solícitos.

Aos meus colegas de jornada, parceiros dentro e fora da universidade, Rubens Silva, Sarah Carvalho, Vinícius Vieira e Kayck Barreto, sou grata por tamanha prontidão e generosidade, obrigada por serem tão afetuosos.

Ao Laboratório de Fitoquímica da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, por ter cedido a fração utilizada no experimento.

A Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade concedida na realização da mobilidade acadêmica, obrigada pela acolhida, por ser papel fundamental na concretização do meu curso, não posso esquecer as amizades que fiz nesta instituição, os quais tornaram meus dias bem mais felizes, Valter Rubens, Brenda Hellen e Olga Varjão.

Meus agradecimentos a Prof. Dr^a Lorena Rocha, pela orientação e oportunidade de estágio que contribuiu de forma relevante para minha formação, e a todos os colegas do Laboratório de Patologia e Histopatologia Veterinária - UFS.

A minha parceira de lar em Sergipe, Alice Palácio, obrigada por dividir sua casa, sua rotina, sua atenção e sua alegria comigo.

A toda minha família que perto ou distante torceram e oraram por mim, em especial a tia Zetty, tia Jucélia e meu tio Edgar, pelo incentivo e ajuda com meus estudos e meu crescimento.

A todos do “Grupo Tô Sabendo Vou Contar”, vocês são demais.

Não posso esquecer de agradecer a Rosa e Caroline Almeida, pelo carinho, cuidado e acolhida quando iniciei a minha jornada na graduação, e em todos momentos que precisei e estavam sempre dispostas, vocês foram fundamentais, minha eterna gratidão.

Por fim, ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro, agradeço por creditar confiança em mim desde o início, apresentando o mundo da pesquisa científica, e por inúmeras vezes não limitar-se a apenas em ser professor, mas ir além de proporcionar o conhecimento, manifestando sempre caráter, afetividade, atenção, apoio, paciência, e acolhimento todas as vezes que foi necessário, sem dúvida tê-lo com professor/orientador fez total diferença na minha formação profissional e pessoal, e se alcanço essa fase, muito disso devo ao senhor professor, obrigada.

REDUÇÃO DO NÚMERO DE TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum* EM CULTURAS DE CÉLULAS DA GLIA DE RATOS INFECTADOS *in vitro*, E TRATADOS COM FRAÇÃO DO MEL DE ABELHA *Tetragonisca angustula*

RESUMO

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo apicomplexa. Esse é o protozoário causador da neosporose, doença que gera grandes perdas econômicas principalmente no rebanho bovino pela capacidade de provocar abortos nesta espécie. Nos cães, pode levar a alterações neuromusculares e problemas reprodutivos, além de doenças neonatal nos equinos. Não existe tratamento efetivo para a neosporose e a falta de terapia faz com que haja a necessidade de adotar medidas profiláticas de controle contra o agente. Diante da ausência de tratamento efetivo para a neosporose, é importante a realização de pesquisas associando à estudos que visem testar novas substâncias terapêuticas para combate deste protozoário. O mel é um produto natural das abelhas, que além de suas propriedades nutricionais, possuem também propriedades farmacológicas que são popularmente conhecidas e de interesse em pesquisas científicas devido a sua capacidade antimicrobiana, antifúngicas, antioxidantes, antiparasitária e anti-inflamatória. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a fração 5 (Fr5) do mel de abelha *Tetragonisca angustula* na concentração (12,5µl/mL), em cultura de células da glia, de ratos frente à infecção com *N. caninum*. Culturas primárias de células gliais foram obtidas a partir do córtex cerebral de ratos recém-nascidos da linhagem Wistar. As células foram tratadas por 24 e 72 horas e em seguida infectadas com *N. caninum* por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada através da atividade das desidrogenases utilizando ensaio MTT. O perfil da resposta imunológica foi realizado através do teste de dosagem de óxido nítrico (NO). Para a avaliação da proliferação do parasito, após período de tratamento e de infecção, realizou-se a contagem de taquizoítos nas diferentes culturas. O tratamento com a Fr5 (12,5µl/mL), promoveu aumento da viabilidade celular quando tratadas por 24h, enquanto que no tratamento por 72 horas a Fr5 apresentou citotoxicidade para células, com diminuição do metabolismo mitocondrial nas culturas tratadas apenas com a Fr5. O tratamento prévio das culturas infectadas com *N. caninum* reduziu a produção de NO nos diferentes tratamentos. Enquanto que nas culturas infectadas a Fr5 (12,5µl/mL), diminuiu a proliferação do parasito. Os dados obtidos sugerem que a Fr5 (12,5µl/mL), atua na redução de taquizoítos de *N. caninum* em culturas de células da glia de ratos neonatos infectadas *in vitro*.

Palavras-chave: astrócitos, mel, neosporose

REDUCTION OF THE NUMBER OF *Neospora caninum* TACHYZOITES AT A *in vitro* GLIAL CELL CULTURES OF NEWBORN INFECTED RATS, AND TREATED WITH FRACTION OF HONEY BEE *Tetragonisca angustula*

ABSTRACT

Neospora caninum is a obligate intracellular parasite belonging to the apicomplexa phylum. This is the protozoan that causes neosporosis, a disease that generates great economic losses, mainly in the cattle herd due to its ability to cause abortions in this species. In dogs, it can lead to neuromuscular changes and reproductive problems, additionally, in horses can cause neonatal diseases. There is no effective treatment for neosporosis and the lack of therapy makes it necessary to adopt prophylactic control measures against the agent. Given the absence of effective treatment for neosporosis, it is important to carry out research in association with studies aimed at testing new therapeutic substances to combat this protozoan. Honey is a natural product of bees, which in addition to its nutritional properties, also have pharmacological properties that are popularly known and of interest in scientific research due to its antimicrobial, antifungal, antioxidant, antiparasitic and anti-inflammatory capabilities. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the fraction 5 (Fr5) of *Tetragonisca angustula* honey in the concentration (12.5µl / mL) in rat glia cells culture against *N. caninum* infection. Primary glial cell cultures were obtained from the cerebral cortex of newborn Wistar rats. The cells were treated for 24 and 72 hours and then infected with *N. caninum* for 72 hours. Cell viability was assessed by dehydrogenase activity using MTT assay. The immune response profile was performed by the nitric oxide (NO) dosage test. To evaluate the parasite proliferation, after treatment and infection, tachyzoites were counted in different cultures. Treatment with Fr5 (12.5µl / mL) promoted increased cell viability when treated for 24 hours, while in 72 hours treatment Fr5 presented cytotoxicity to cells, with decreased mitochondrial metabolism in cultures treated with Fr5 alone. In previous treatment of *N.caninum*-infected cultures was observed reduction on NO production in different treatments. While in infected cultures, Fr5 (12.5µl / mL) decreased parasite proliferation. The data obtained suggest that Fr5 (12.5µl / mL) acts on the reduction of tachyzoites of *N. caninum* in glial cell cultures of *in vitro* infected newborn Wistar rats.

Keywords: astrocytes, honey, neosporosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de invasão celular de taquizoíto de <i>Neospora caninum</i> . (A) anel apical; (C) conoíde; (D) grânulo denso; (M) micronema; (N) núcleo; (P) anel polar; (R) roptria; (a) adesão; (b) invasão; (c) penetração; (d) estabelecimento do vacúolo parasitóforo.....	16
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	18
Figura 3: Estágios de <i>Neospora caninum</i> . (A) taquizoíto, (B) Bradizoítos, (C) Cisto contendo bradizoítos, (D) oocisto não-esporulados e, (E) oocistos esporulado.....	19
Figura 4: Preparo de soluções, cultivo de células Vero e taquizoítos de <i>N. caninum</i> . A. Preparo de soluções; B. Fluxo laminar; C. Repique de célula Vero; D. Meio de cultura RPMI 1640; E. Troca de meio das culturas de Vero e <i>N. caninum</i> ; F. Observação em microscopico de epifluorescência (OLYMPUS®, CKX41).....	31
Figura 5: Purificação de taquizoítos de <i>N. caninum</i> . A. Coleta de taquizoítos das garrafas de cultivo; B. Passagem do concentrado de taquizoíto em seringa com agulha 22G; C. Filtração, em filtro de 5 µm (Millex®, Millipore); D. Preparo da câmara de Newbauer para contagem de taquizoítos.....	33
Figura 6: Método de conversão do MTT. A e B: Plaqueamento.....	34
Figura 7: Dosagem de proteína. A. Lavagem do tapete celular, sobre banho de gelo; B. Passagem do screp para remoção do tapete; C. Coleta; D e E. Preparação de soluções e plaqueamento.	35
Figura 8: Dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess. A, B, C, D. Plaqueamento.	36
Figura 9: Contagem de taquizoíto de <i>N. caninum</i> . A. Passagem do screp. B e C. Avaliação do volume total.	37
Figura 10. Análise do efeito da Fr5 (12,5µg/mL), na viabilidade de células glias verificada através do teste de MTT. Resultados expressos em média ± SEM (n=4). (*) representa diferença estatística em relação ao grupo tratado com o controle, com valor de p<0,05. Testes estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's.	38
Figura 11. Análise do efeito da Fr5 (12,5µg/mL), na viabilidade de células glias verificada através do teste de MTT. Resultados expressos em média ± SEM (n=4). Não houve significância estatística do grupo tratado comparada com o controle; (#)	

p<0,05 comparada com o controle; (#) p<0,05 comparada com as células infectadas (Nc). Testes estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's..... 39

Figura 12. Dosagem de nitrito em cultura primária de células gliais tratadas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula* por 24h e infectadas com taquizoítos de *N. caninum*. Os dados são representados em média \pm SEM, (n=6), significância estatística mostrada como (**) p<0,01 comparada com o controle. Testes estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's..... 40

Figura 13. Dosagem de nitrito em cultura primária de células gliais tratadas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula* por 72h e infectadas com taquizoítos de *N. caninum*. Os dados são representados em média \pm SEM, (n=6), significância estatística mostrada como (***) p<0,001 comparada com o controle. Testes estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's..... 40

Figura 14. Quantificação de taquizoítos de *N. caninum* em cultura primária de células gliais tratadas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula*, na concentração de (12,5 μ g/mL), por período de 24h e infectadas por 72h. Os dados são representados em mediana \pm SEM, (n=4), significância estatística mostrada como (*) p<0,05 comparada com as células em condição controle. Testes estatísticos: Teste "t" com pós-teste Mann Whitney..... 41

Figura 15. Quantificação de taquizoítos de *N. caninum* em cultura primária de células gliais tratadas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula*, na concentração de (12,5 μ g/mL), por período de 72h e infectadas por 72h. Os dados são representados em mediana \pm SEM, (n=4), significância estatística mostrada como (*) p<0,05 comparada com as células em condição controle. Testes estatísticos: Teste "t" com pós-teste Mann Whitney..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Dióxido de carbono
ELISA	Teste imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
Fr5	Fração 5
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina-12
MTT	[3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]
NC	<i>Neospora caninum</i>
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação de polimerase em cadeia
SNC	Sistema nervoso central
ml	Microlitro
μ g	Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. <i>Neospora caninum</i>	15
2.2. Características antigênicas	15
2.3. Epidemiologia	16
2.4. Ciclo biológico	17
2.5. Neosporose	19
2.6. Sinais clínicos	20
2.7. Diagnóstico	21
2.8. Patogenia e resposta imune do hospedeiro frente à infecção por <i>Neospora caninum</i>	22
3. SISTEMA NERVOSO CENTRAL	24
3.1. População celular do sistema nervoso central	24
3.2. Sistema nervoso central e a infecção por <i>Neospora caninum</i>	25
4. MEL	27
4.1. Propriedades profiláticas do mel	27
5. OBJETIVOS	29
5.1. Gerais	29
5.2. Específicos	29
6. MATERIAIS E MÉTODOS	30
6.1. Declaração do Comitê de Ética	30
6.2. Cultura de <i>Neospora caninum</i>	30
6.3. Obtenção da fração do mel de abelha <i>Tetragonisca angustula</i>	30
6.4. Cultura de células da glia	31
6.5. Tratamento e infecção das células gliais	32
6.6. Avaliação da viabilidade celular	32
6.7. Dosagem de proteína	33
6.8. Dosagem de óxido nítrico	34
6.9. Contagem de parasito	35
6.10. Análises estatísticas	36
7. RESULTADOS	38
7.1. Efeito induzido pelo tratamento e infecção – MTT	38
7.2. Produção de óxido nítrico	39
7.3. Determinação da proliferação do parasitária	41
8. DISCUSSÃO	43
9. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença parasitária mundialmente conhecida por induzir abortamentos em bovinos, causando grandes perdas econômicas na indústria agropecuária mundial. É causada pelo protozoário coccídio *Neospora sp.* O qual é capaz de infectar uma ampla variedade de espécies (DUBEY, 1988).

Já foram descritos até o momento duas espécies desse gênero, o *N. hughesi* isolado de cérebro e medula espinhal de equino (MARKS et al., 1998), e o *N. caninum* que foi isolado do encéfalo de cão (DUBEY et al., 1988).

O sistema nervoso é composto por uma variedade de células que são responsáveis por diversas funções entre elas destacam-se os neurônios e as células da glia. Os neurônios são responsáveis pelas transmissões dos estímulos através de potencial elétrico de membrana, tornando possível o estabelecimento de respostas fisiológicas ideais com o meio interno e externo ao organismo, as células da glia fazem parte da sustentação, dos mecanismos de defesa, e participam das atividades neuronal e nutricional, as células da glia incluem os astrócitos, os oligodendrócitos e as microglia (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). *N. caninum* tem predileção pelos tecidos do sistema nervoso central, onde a forma cística do protozoário são comumente encontradas em tecidos neurais, os quais podem levar a alterações neurológicas (DUBEY et al., 2002).

Estudos demonstram que o mel possui propriedades terapêuticas, e vêm buscando identificar o potencial antimicrobiano, antiparasitário, efeitos imunológicos, anti-inflamatórios, analgésicos, sedativos e expectorante de méis produzidos por diferentes espécies de abelhas melíferas (BREYER, 1983; BOBANY et al., 2010; TOMAZZONI et al. 2006; MAVRIC et al., 2008; ETERAF-OSKOU EI et al., 2013).

Diante da necessidade de obter novos métodos terapêuticos eficientes no combate a infecção por *N. caninum* diversos estudos vêm sendo realizado. Devido às propriedades medicinais do mel, este tem se tornando objeto de estudo em diversas pesquisas. Portanto, este trabalho pretendeu avaliar a ação antiprotozoária da fração do mel de abelha *Tetragonisca angustula*, sobre as células da glia de ratos neonatos, infectados *in vitro* com *N. caninum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Neospora caninum*

Neospora caninum, agente causador da neosporose, é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (DUBEY et al., 1988). O gênero *Neospora sp.*, possui duas espécies já descritas na literatura, *N. caninum*, este isolado no cérebro de cão, e *Neospora hughesi*, isolado apenas no cérebro e medula espinhal de eqüinos (DUBEY et al., 1988; DUBEY et al., 2001).

N. caninum é análogo ao protozoário *Toxoplasma gondii*, com similaridades relacionadas às características fenotípicas, ao ciclo biológico, a formação de cistos nos tecidos e quanto a excreção de oocistos. Apesar desta características comum com *T. gondii*, *N. caninum* apresenta componentes antigênicos diferenciados (DUBEY et al., 1988).

Na Noruega em 1984, Bjerkas e colaboradores observaram em cães da raça boxer com distúrbios neurológicos, a presença de cistos, que se diferenciavam morfológicamente dos cistos formados por *T. gondii*, que não foram positivos para essa doença.

Dubey e colaboradores em 1988, através de estudos de cortes histológicos de cães, constaram que os cistos formados pelo taquizoítos semelhante ao *T. gondii* se tratavam de uma nova espécie de protozoário. Quando comparadas a estrutura e antigenicidade dos parasitos, concluíram que se tratava de uma nova espécie, e denominaram de *N. caninum* (DUBEY, 1988).

2.2. Características antigênicas

N. caninum apresenta um complexo apical formado por estruturas especializadas, compostas por organelas secretoras como as micronêmas, as roptrias e os grânulos densos. Estas estruturas são importante para a invasão, multiplicação e manutenção dos taquizoítos nas células do hospedeiro, permitindo assim o ciclo do parasito. As micronêmas localizam-se na porção anterior dos taquizoítos. Os grânulos densos encontram-se dispersos por todo citoplasma, com uma maior concentração

na porção posterior. As roptrias são encontradas em número de 6 a 16 (DUBEY e LINDSAY,1996; DUBEY et al., 2002).

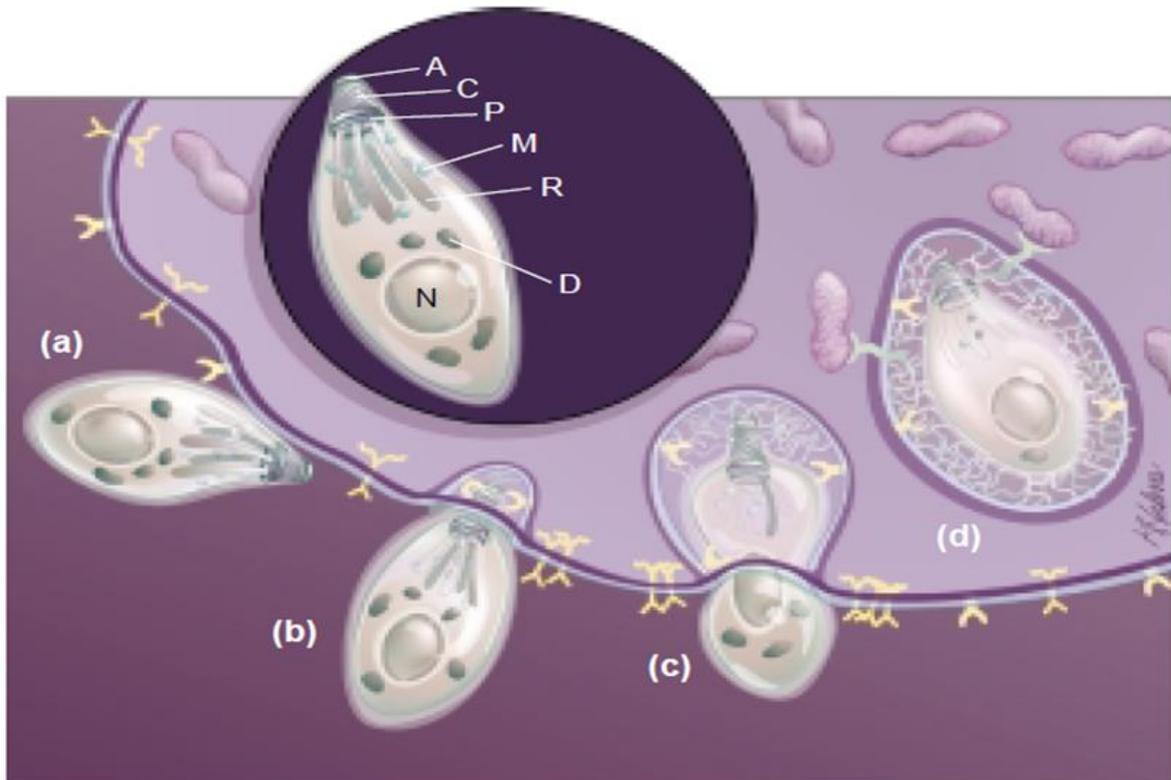


Figura 1: Processo de invasão celular de taquizoíta de *Neospora caninum*. (A) anel apical; (C) conoide; (D) grânulo denso; (M) micronema; (N) núcleo; (P) anel polar; (R) roptria; (a) adesão; (b) invasão; (c) penetração; (d) estabelecimento do vacúolo parasitóforo. (Adaptado de BUXTON, 2002).

2.3. Epidemiologia

A neosporose apresenta distribuição geográfica mundial. Em 1996 foi realizado um estudo sorológico para *N. caninum* em bovinos no Brasil, no Mato Grosso do Sul e no estado de São Paulo (BRAUTIGHAM et al., 1996). Em 1999, foi realizado o primeiro estudo de soroprevalência em bovinos, no estado da Bahia, no qual foram identificados anticorpos anti-*Neospora caninum* em 14,09% (63/447) das amostras analisadas (GONDIM et al., 1999). A detecção de *N. caninum* na Bahia foi feita por Gondim e colaboradores em 2001, realizada em tecidos de um feto abortado, através da técnica de imunohistoquímica. A primeira cepa de isolado de *N. caninum*, a cepa

NC – Bahia, foi isolado dos tecidos de um cão da raça Collie naturalmente infectado (GONDIM et al., 2001).

2.4. Ciclo biológico

O parasito possui um ciclo de vida heteroxeno envolvendo hospedeiros definitivos e hospedeiros intermediários. O cão (*Canis familiaris*), o coiote (*Canis latrans*), o dingo (*Canis lupus dingo*) e o lobo cinza (*Canis Lupus*) são os hospedeiros definitivos do *N. caninum* (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011). Como hospedeiros intermediários, *N. caninum* possui uma ampla variedade de espécies silvestres e domésticas, incluindo os ruminantes (DUBEY e LINDSAY, 1996).

A principal via de transmissão de *N. caninum* é a oral, responsável pela transmissão horizontal do parasito (McALLISTER, 1998). Nesta via de transmissão o hospedeiro se infecta por ingestão de alimentos e água contaminada com oocistos ou através do consumo de tecidos contendo bradizoítos do protozoário. (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006). Esta é a principal forma de infecção em carnívoros por meio do consumo de carcaças de hospedeiros intermediários contendo cistos do protozoário ou restos fetais infectados com *N. caninum* (DUBEY, 2003; GONDIM, 2006).

Outra forma de transmissão do parasito é a vertical, por via transplacentária, estabelecendo assim a principal via de infecção para os rebanhos bovinos (WILLIAMS et al., 2007).

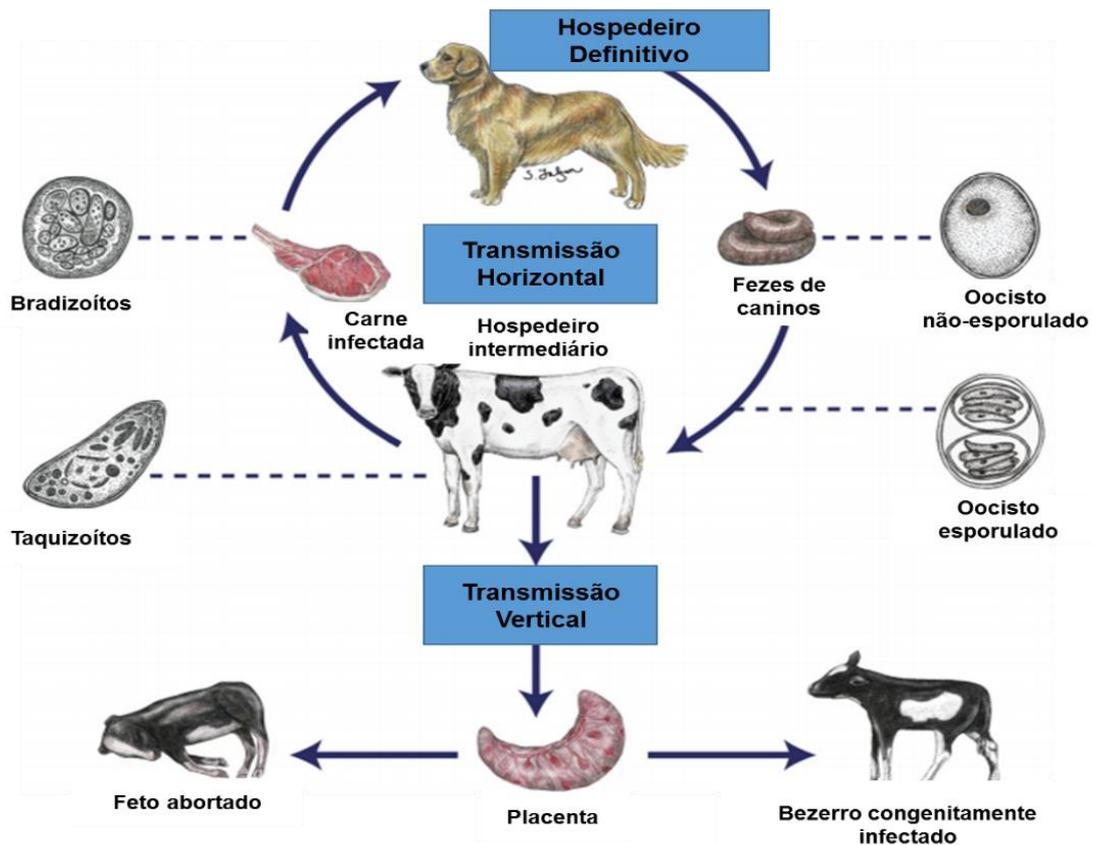


Figura 2: Ciclo biológico de *Neospora caninum*. (Adaptado de GOODSWEN, 2013).

O ciclo biológico de *N. caninum*, possui três estágios evolutivos: os taquizoítos, forma de rápida multiplicação nos tecidos; cistos teciduais contendo bradizoítos; e os oocistos contendo esporozoítos, encontrados no interior dos oocistos esporulados. Estes são eliminados única e exclusivamente nas fezes dos hospedeiros definitivos. Os estágios estão relacionados principalmente com a fase da infecção e da resposta do hospedeiro (DUBEY, 1999; DUBEY et al., 2002).

Os taquizoítos, a depender do estágio de desenvolvimento, podem apresentar morfologia ovóide, circulares ou de meia lua e medem 3-7 x 1-5µm. Esta é fase do parasito que causa infecção aguda no hospedeiro intermediário (DUBEY et al., 1988).

Os bradizoítos estão relacionados com a fase crônica da doença, encontram-se no interior de cistos teciduais e multiplicando-se lentamente (DUBEY et al., 1988). Possuem formato delgado de 6 a 8 µm de comprimento por 1 a 1,8 µm de largura, e são considerados como a forma de resistência do parasito (DUBEY e LINDSAY, 1996). Os bradizoítos podem permanecer por longos períodos no interior dos cistos

teciduais de forma que não provoque nenhuma manifestação clínica (BUXTON et al., 2002). Este estágio está presente tanto em hospedeiros definitivos como nos intermediários, correspondendo à reprodução assexuada (DUBEY et al., 2007).

Os oocistos medem cerca de 10 a 11 μm de diâmetro, apresentam uma parede lisa, com forma esférica ou sub-esférica, não possuem capacidade infectante, mas em condições ambientais favoráveis, esporulam e tornam-se infectantes (McALLISTER et al., 1998). Quando sofrem o processo de esporulação apresentam dois esporocistos com quatro esporozoítos alongados medindo cerca de 6,5 x 2,0 μm , assumindo sua forma infectante, capaz de promover a infecção por via oral (DUBEY et al., 2002).

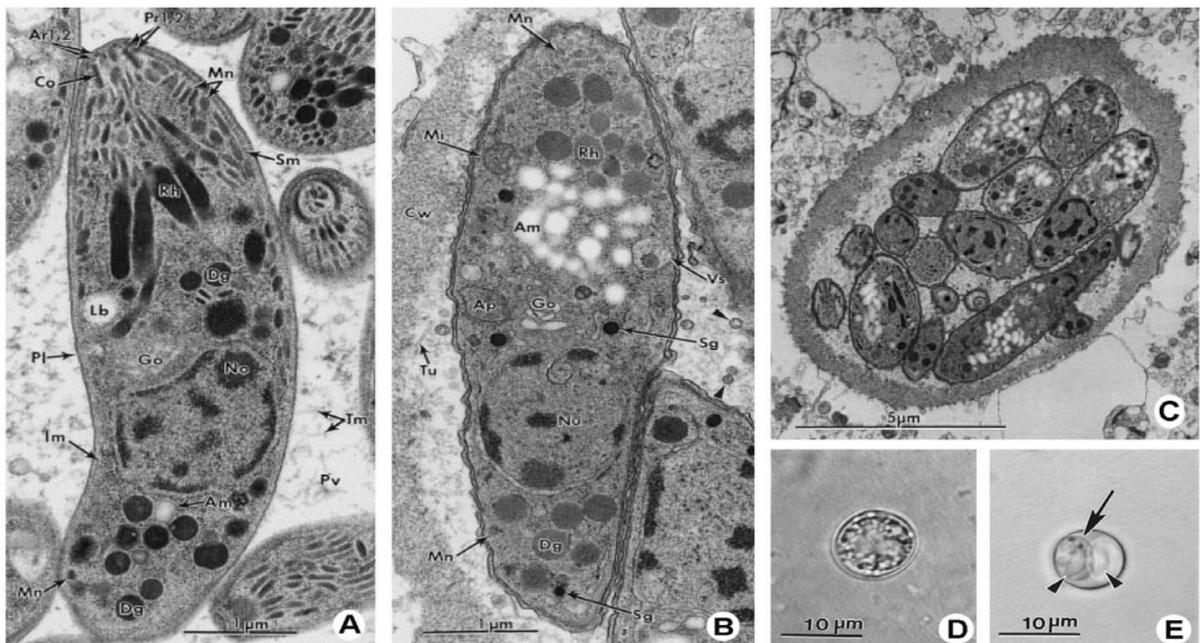


Figura 3: Estágios de *Neospora caninum*. (A) taquizoíto, (B) Bradizoítos, (C) Cisto contendo bradizoítos, (D) oocisto não-esporulados e, (E) oocistos esporulado. (Adaptado de GOODSWEN).

2.5. Neosporose

A neosporose é relatada como uma das principais doenças causadoras de abortos em bovinos em todo mundo (DUBEY, 2003) e está amplamente disseminada no Brasil (CAMILLO et al., 2010). A capacidade de *N. caninum* em converter-se em cistos ou em forma infectante novamente, através de mecanismo modulador de acordo as suas necessidades, e na sua habilidade em infectar uma variedade de

células, garante assim, a sobrevivência e perpetuação deste parasito (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 2006).

Estudos demonstram que os cistos teciduais de *N. caninum* têm sido encontrados em uma variedade de tecidos, a exemplo do cérebro, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins, membranas fetais, placenta, músculos e pele (DUBEY e LINDSAY, 1996; PETERS et al., 2001). *N. caninum* já foi detectado em várias espécies de animais vertebrados domésticos e silvestres (ALMERÍA et al., 2002). A capacidade de infectar diversas espécies domésticas e silvestres tem um papel importante na epidemiologia uma vez que a presença desses animais pode implicar na prevalência da doença principalmente em regiões rurais (ALMERÍA et al., 2013).

A neosporose possui uma grande importância na economia agropecuária mundial (DUBEY e SCHARES, 2011). Uma pesquisa sobre os prejuízos econômicos decorrentes da neosporose, demonstrou que as perdas mundiais anuais são estimadas em mais de um bilhão de dólares (REICHEL et al., 2013). Estes impactos econômicos estão relacionados principalmente às perdas reprodutivas, incluindo retorno ao cio, aborto, e ao nascimento de animais debilitados (LIMA et al., 2007). Os prejuízos estão relacionados tanto aos valores dos fetos abortados, quanto aos gastos indiretos como custo com profissionais, redução da vida reprodutiva e com diagnósticos (REICHEL et al., 2013).

As pesquisas que visam avaliar os fatores de riscos associados à infecção por *N. caninum* demonstram que eles são apontados como respostas para a compreensão da distribuição e desenvolvimento da neosporose nos animais (DUBEY et al., 2007). A literatura ressalta que estes estudos são importante para compreensão da epidemiologia da neosporose e para investigar o risco de infecção por *N. caninum*. Dentre os fatores analisados encontram-se, idade dos animais; a fonte hídrica; o tipo de alimentação; o clima da região; o manejo higiênico-sanitário; o consórcios com outras espécies de risco; o acesso de animais silvestres com a criação bem como com outras espécies domésticas, como os cães e gatos e seus respectivos hábitos alimentares e comportamentais (BARTLES et al., 2006; DUBEY et al., 2007; MOURA et al., 2013; WOUUDA et al., 1999; ABREU et al., 2014).

2.6. Sinais clínicos

Os sinais clínicos podem ser variados, que depende do sítio parasitado. Nos cães, os sinais neurológicos podem apresentar-se com hiperextensão rígida dos membros posteriores, dificuldade em deglutir, paralisia mandibular, flacidez muscular, atrofia muscular e paralisia de nervos faciais (BARBER et al., 1996; DUBEY, 2003; DUBEY e LINDSAY, 1996).

Estudos demonstram que os bovinos possuem uma maior susceptibilidade a neosporose e a infecção pelo parasito está associada a problemas reprodutivos, má formação fetais, abortos, mumificação fetal e danos neuromusculares nos neonatos (BARTLEY et al., 2013). Nos equinos está relacionada principalmente ao sistema nervoso central, com sinais neurológicos, incoordenação dos membros, mieloencefalite e ataxia (DUBEY, 2003). A neosporose nos equinos também se apresenta com distúrbios reprodutivos, abortamentos, e doenças neonatais (LINDSAY, 2001).

2.7. Diagnóstico

O diagnóstico da neosporose é difícil de ser realizado clinicamente, devido aos seus sinais clínicos inespecíficos, sendo necessárias análises laboratoriais para confirmação da infecção (PACKMAM et al., 2002). Para diagnóstico desta enfermidade existem métodos diretos e indiretos, sendo que os testes parasitológicos são caracterizados como método de diagnóstico direto, e os métodos indiretos são os testes sorológicos (DUBEY et al., 2007).

A exemplo de métodos diretos há ainda diagnóstico histopatológico, o isolamento do *N. caninum* em cultura de células e tecidos de camundongos, a imunohistoquímica, e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Entre os métodos indiretos estão ensaio imunoenzimático (ELISA), soroaglutinação direta, e a imunofluorescência indireta (IFI) (DUBEY et al., 2007; DUBEY et al., 1998; VAN MAANEN et al., 2004; JENKINS et al., 1997; ATKINSON, 2000; PACKHAM et al., 1998; HEMPHILL et al., 2000). A imunofluorescência indireta foi o primeiro método sorológico padronizado para o diagnóstico de *N. caninum* e considerado como referência na pesquisa de anticorpos para este agente (HEMPHILL et al., 2000).

Não existem medicações efetivas e seguras no mercado para a prevenção e tratamento da infecção por *N. caninum* (DUBEY et al., 2007). A profilaxia vacinal é

uma medida existente, porém sem resultados eficazes. Diante da ausência de tratamento para a neosporose é importante a realização de novos estudos que visem o combate deste agente por meio de quimioterápicos (HEMPHILL; AGUADO-MARTÍNEZ; MÜLLER, 2016).

2.8. Patogenia e resposta imune do hospedeiro frente à infecção por *Neospora caninum*

N. caninum causa a morte das células do hospedeiro devido à multiplicação dos taquizoítos no seu interior. Proteínas são usadas como receptores para reconhecer a célula hospedeira, estabelecendo a infecção, o parasito atinge as células alvo através das vias sanguíneas e linfáticas, disseminando-se e provocando lesões graves em diversos órgãos (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002). O reconhecimento das células dos hospedeiros, por meio das proteínas que são usadas como receptores, permite a invasão ativa do parasito na célula, e posteriormente a formação do vacúolo parasitóforo (HEMPHILL et al., 1996). Então ocorre a multiplicação por endodiogenia, processo que acontece após algumas horas de infecção, com formação de centenas de taquizoítos, o que ocasiona a lise celular e a liberação dos taquizoítos que avançarão invadindo as células vizinhas (DUBEY, 2000; BUXTON et al., 2002).

A invasão dos taquizoítos promove uma reação inflamatória. Diante de uma resposta imune efetiva contra os taquizoítos de *N. caninum*, acontece o encistamento resultando na formação dos cistos teciduais, os quais contém bradizoítos, forma latente do agente que não provoca sinais clínicos no hospedeiro. No entanto, na ausência de uma resposta imune efetiva, ocorre a proliferação de taquizoítos e o hospedeiro pode apresentar diversas alterações clínicas (LINDSAY e DUBEY, 2000).

A resposta imune celular desempenha um papel fundamental frente à infecção por este agente. *N. caninum* é capaz de estimular uma resposta imune celular e humoral (HEMPHILL, 1999; INNES et al., 1995). O primeiro mecanismo de defesa ativado pelo hospedeiro frente à infecção de *N. caninum* é a resposta inata, com o reconhecimento do agente, mediada por células *Natural killer*, macrófagos e neutrófilos, envolvendo a liberação de quimiocinas e ativação de leucócitos que estão envolvidos no processo inflamatório (TAUBERT et al., 2006; HEMPHILL et al., 2006).

A resposta imune celular frente à infecção por *N. caninum*, desenvolve um padrão de resposta do tipo Th1, com liberação de citocinas pró-inflamatória, as quais contribui para inibição da multiplicação dos taquizoítos (KHAN et al., 1997; INNES et al., 2005).

Na resposta celular a interleucina-12 (IL-12) possui uma grande importância na resposta imune, pois esta, ativa as células *Natural killer*, participa da ativação de TCD4+ e TCD8+ e associado ao IFN- γ (interferon-gama) estabelece uma resposta inflamatória importante no combate ao *N. caninum*, contendo sua multiplicação. A neutralização dos parasitos extracelulares ocasiona assim a formação de cistos teciduais e atua sobre as células infectadas destruindo-as (INNES et al., 2005; MONNEY e HEMPHILL, 2014).

A resposta humoral é mediada por anticorpos específicos, que atuam com a função de opsonização, neutralização e ativação do complemento, que destrói os taquizoítos, impedindo a sua penetração em novas células. Os taquizoítos são então levados a diferenciar-se em bradizoítos formando cistos teciduais (MARKS et al., 1998).

3. SISTEMA NERVOSO CENTRAL

3.1. População celular do sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) é formado por uma variedade de células, que fazem a estruturação, desempenhando complexas e essenciais funções (KREBS, WEINBERG & AKESSON, 2013). Estas variedades de células se dividem em dois grupos celulares: os neurônios e as células da glia. Os neurônios são as células responsáveis pelas transmissões dos estímulos através de potencial elétrico de membrana, tornando possível o estabelecimento de respostas fisiológicas ideais com o meio interno e externo ao organismo. As células da glia participam da sustentação, dos mecanismos de defesa, participam das atividades neuronal e nutricional e estão envolvidas em complexas funções do sistema nervoso. Elas possuem importante interação com os neurônios e são fundamentais para restauração da homeostase cerebral. As células da glia incluem os astrócitos, os oligodendrócitos e as microglia (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; JHA et al., 2018).

Os astrócitos representam as células mais numerosas da glia, desempenhando diversas funções como: o fornecimento de suporte físico e metabólico aos neurônios; promovem a manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, ação importante para a homeostase do SNC; liberam e captam neurotransmissores; e participam na formação da barreira hematoencefálica. Além disso, também estão envolvidos nos mecanismos de defesa do organismo, através da síntese e secreção de diversas citocinas inflamatórias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; OLUDE et al., 2015; GOMES, TORTELLI e DINIZ, 2013; ROUACH et al., 2008).

Estruturalmente, os astrócitos possuem uma morfologia estrelada devido aos seus prolongamentos. Alterações e disfunções astrocíticas podem estar relacionadas a distúrbios neurológicos. Os astrócitos são as primeiras células a responderem a processos patológicos e lesões ao SNC (STIPURSKY et al., 2012; NOREMBERG, 1994). Estes se tornam reativos em resposta a processos patológicos, alterações metabólicas e infecções. Esta reatividade é caracterizada pela atrofia celular (MATIAS; MORGADO; SOSUNOV et al., 2014).

Os oligodendrócitos são células menores que os astrócitos, possuem poucos prolongamentos que estão localizados na substância cinzenta do SNC. São

responsáveis pela formação da bainha de mielina, e ainda auxiliam no controle do pH extra celular (BEAR, 2002).

As microglias correspondem de 5 a 20% do total de células da glia, desempenham funções imunológicas, atuando como células apresentadoras de antígenos e na remoção de restos celulares. Esta pode ser ativada mediante a liberação de moléculas pró-inflamatórias (GINHOUX et al., 2013; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Em condições fisiológicas, estas células mantêm-se em repouso, em estado de vigilância, com morfologia ramificada, corpo celular compacto e processos alongados (AU; MA, 2017). Em situação de alterações fisiológicas e metabólicas do SNC, as microglias mudam suas características fenotípicas rapidamente, adotando uma aparência ameboide, com encurtamento dos processos celulares, e aumento do corpo celular (SAIJO e GLASS, 2011).

3.2. Sistema nervoso central e a infecção por *Neospora caninum*

N. caninum pode parasitar uma variedade de tecidos, mas apresenta um maior tropismo pelo SNC. Cistos em tecidos neurais são comumente encontrados e podem permanecer durante toda a vida dos hospedeiros, o que ocasiona ou não alterações clínicas significativas (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2006). A patogênese de *N. caninum* em invadir o SNC e causar as principais alterações clínicas no hospedeiro, deve-se a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, mas os mecanismos pelos quais o parasito atravessa a barreira e atinge as células do SNC ainda não são totalmente elucidados (VONLAUFEN et al., 2002; YAMANE et al., 2000).

Atravessando a barreira hematoencefálica o *N. caninum* é capaz de infectar as células gliais e os neurônios, podendo levar a alterações neurológicas. Estudos *in vitro* sobre a resposta do SNC frente à infecção por *N. caninum*, demonstram o perfil de resposta que este sistema libera diante da infecção por *N. caninum*. O estudo de Yamane et al., (2000), utilizou tecidos do SNC de fetos bovinos abortados, para avaliar a resposta inflamatória neste sistema, frente à infecção por *N. caninum*, e apontou um perfil de citocinas inflamatórias INF- γ e TNF, ambos atuando como inibidores no crescimento parasitário.

Pinheiro et al., (2006), observaram um aumento de IL-10, TNF, óxido nítrico e a presença de eventos de astrogliose, em culturas de astrócitos de ratos infectados *in vitro* por *N. caninum*. Estes achados indicam que o NO e as citocinas do tipo Th1 podem desempenhar uma importante ação nos mecanismo de defesa do SNC do hospedeiro frente à infecção por este agente.

O cultivo *in vitro* de células da glia, é um método eficaz de obter respostas a respeito do comportamento do protozoário *N. caninum* no meio intracelular (PINHEIRO et al., 2006).

4. MEL

O mel é um alimento natural produzido por abelhas melíferas a partir do néctar das flores e das excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas. Por meio desta matéria-prima as abelhas elaboram o mel (CAMPOS, 2000). O mel é constituído basicamente por uma variedade de açúcares, com predominância da frutose e glucose, mas é composto também por outras substâncias como ácidos orgânicos outros carboidratos, enzimas, vitaminas, flavonoides, minerais e por outras inúmeras variedades de compostos orgânicos. O sabor e aroma é dependente da origem da planta utilizada pelas abelhas para obtenção do mel (SILVA et al., 2006).

O mel possui um aspecto viscoso, adocicado e normalmente apresenta-se com um aroma agradável. Além de ser um alimento com elevado potencial nutricional, possuem diversas propriedades terapêuticas, dentre elas a ação antimicrobiana e cicatrizante, característica conhecida e usada desde a antiguidade (CORTOPASSI-LAURINO e GELLI, 1991).

Dentre as abelhas com ferrão e sem ferrão meliponíneas que podem ser encontradas no Brasil tem-se a *Tetragona claviceps* (Borá), *Meliponsubnitida* (Jandaíra), *Meliponaquadrifasciata* (Mandaçaia), *Meliponascutellaris* (Urucu Nordestina), *Plebeia spp.* (Mirins) e *Tetragonisca angustula* (Jataí) (NOGUEIRA-NETO, 1997). A *T. angustula* conhecidas popularmente por Jataí são abelhas de pequeno porte, presente em quase todo território brasileiro, produtoras de um excelente mel, de aspecto suave, fino e moderadamente azedo, características estas que o difere dos demais méis. A *T. angustula* não é uma espécie agressiva, o que facilita seu manejo (NOGUEIRA-NETO, 1997).

4.1. Propriedades profiláticas do mel

Estudos demonstram que o mel possui propriedades antibacterianas, esta característica auxilia na cicatrização de feridas, principalmente pela ação de barreira que o mel pode exercer sobre uma lesão impedindo a entrada de substâncias (CORTOPASSI-LAURINO e GELLI, 1991; DELMAS, VIDON e SEBALD, 1994). Possui ação anti-oxidante (AL-MAMARY, AL-MEERI HABORI e AL- HABORI, 2002),

podendo atuar como protetor de mucosa contra doenças gastrointestinais (PRAKASH et al., 2008), e ação antiinflamatória (TONKS et al., 2003; TONKS et al., 2007).

As propriedades terapêuticas do mel estão associadas principalmente aos compostos fenólicos presentes na sua composição (SILVA, QUEIROZ e FIGUEIRÊDO, 2004). O mel contém flavonoides, ácidos fenólicos; compostos químicos como: enzimas, reação de Maillard; ácidos orgânicos, derivados de carotenoide; e propriedades físico-químicas como: alta pressão osmótica, baixa atividade de água, baixo pH, baixo conteúdo proteico, saturação devido ao seu alto teor de açúcares, dentre outras características (WESTON, 2000; TOMASBARBERAN et al., 2001; KENJERIC et al., 2007; BOGDANOV, 1997).

Os flavonoides são os principais responsáveis por diversas atividades biológicas com potencial terapêutico, ação antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, e moduladora do sistema imune (ALVAREZ et al., 2010; GONÇALVES, 2005; IRISH, 2006; TONKS, 2003; TONKS, 2007).

Os compostos fenólicos possuem um papel muito importante, estimulando a produção de óxido nítrico, o qual é essencial ao sistema imune para o combate aos microrganismos (CARLOS, et. al, 2009).

O nível da atividade antimicrobiana está relacionada com teor fenólico e com a quantidade de flavonoides que o mel possui (ALVAREZ et al., 2010). Estas substâncias são conhecidas por seu potencial farmacológico, pois possui efeito modulatório sobre diversos processos fisiológicos, devido a propriedades terapêuticas já citadas (LIANDA e CASTRO, 2008).

É importante a realização de novos estudos que visem avaliar as propriedades terapêuticas e as atividades imunomodulatórias do mel, para que a partir deste produto natural, possam produzir mais drogas eficazes, no combate a diversas afecções (TOMAZZONI et al., 2006; ALVES et al., 2008).

5. OBJETIVOS

5.1. Geral

Avaliar a capacidade biológica da fração do mel de abelha *Tetragonisca angustula* frente à infecção de *Neospora caninum* em culturas de células da glia.

5.2. Específicos

- Verificar a viabilidade celular pelo teste de MTT, das células da glia tratadas com a fração do mel e infectadas por *N. caninum*.
- Verificar produção do óxido nítrico.
- Verificar número de taquizoítos de *N. caninum* nas culturas de células da glia tratadas com mel de *Tetragonisca angustula* e infectadas com *N. caninum*.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Declaração do Comitê de Ética

Todos os protocolos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, protocolo de número: 23007.019525/2017.

6.2. Cultura de *Neospora caninum*

Taquizoítos da cepa NC-Bahia (GONDIM et al., 2001) foram mantidos em monocamada de células Vero (Linhagem Celular de Rins de Macaco-Verde Africano), com trocas regulares de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO® 12657 – Invitrogen) e solução de antibiótico e antimicótico na concentração 0,1% contendo Penicilina e estreptomicina (Sigma® Life Science A5955 – Aldrich Brasil Ltda) , trocado a cada 48 horas. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO₂.

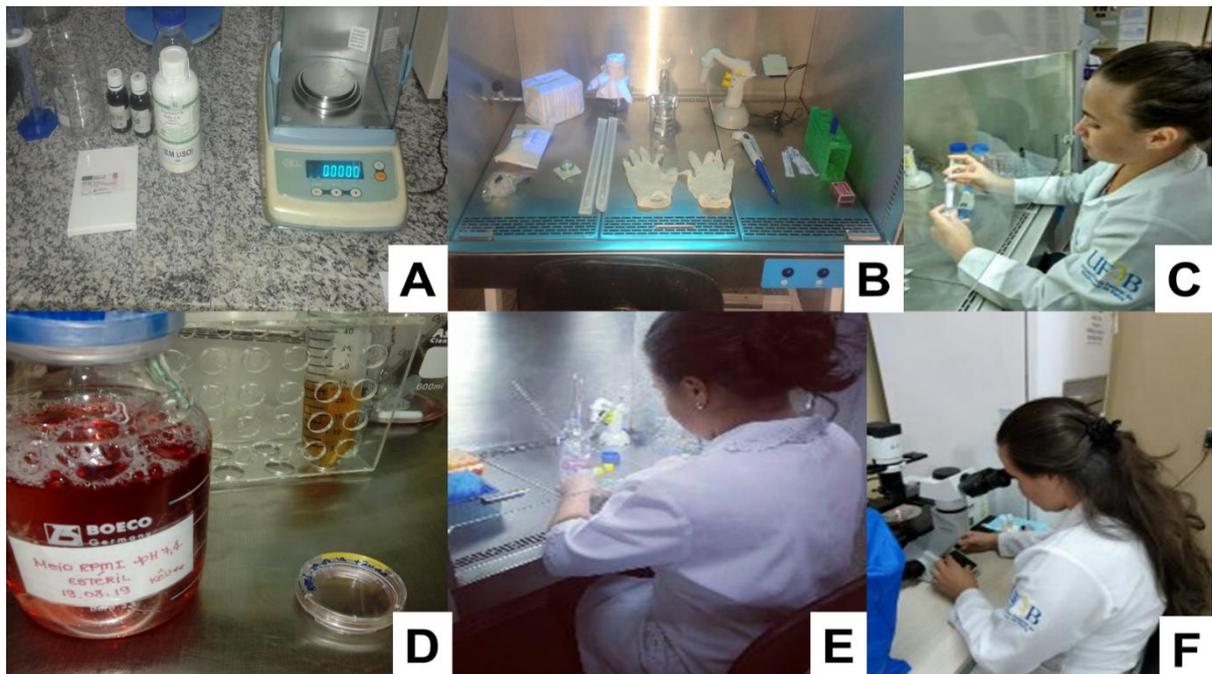


Figura 4: Preparo de soluções, cultivo de células Vero e taquizoítos de *N. caninum*. A. Preparo de soluções; B. Fluxo laminar; C. Repique de célula Vero; D. Meio de cultura RPMI 1640; E. Troca de meio das culturas de Vero e *N. caninum*; F. Observação em microscopio de epifluorescência (OLYMPUS®, CKX41). (Fotografias do arquivo pessoal).

6.3. Obtenção da fração do mel de abelha *Tetragonisca angustula*

O extrato bruto do mel foi concentrado em aparelho de rotoevaporação e posteriormente fracionado por coluna cromatográfica de sílica gel C18. Foram obtidas 8 frações, mas para a realização deste trabalho, foi disponibilizada a fração de número 5 (Fr5), através parceria com o Laboratório de Fitoquímica da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. A Fr5 em diferentes concentrações foi testada em uma curva dose/resposta com o teste de MTT, para estabelecer qual seria usada no estudo. A Fr5 (12,5µg/m) foi mantida em refrigeração até o momento do uso.

6.4. Cultura de células da glia

Foram utilizados cortex de ratos Wister neonatos (*Rattus norvegicus*), com menos de 48 horas de vida, provenientes do biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. Para obtenção das células da glia, o cortex foi retirado da calota craniana e dissociado mecanicamente. As células foram semeadas em garrafas contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO® 12657 – Invitrogen), 1mM de ácido pirúvico (SIGMA®) e 2mM de glutamina (SIGMA®). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 15 dias, com trocas do meio a cada 48 horas. Após esse período as culturas foram tripisinizadas, contadas e plaqueadas, em placas de cultura celular de 96 poços com fundo chato (K12-096 KASVI®) para análises do MTT [3 - (4,5 dimetiltiazol-2yl) - 2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]. Para a dosagem de proteínas, óxido nítrico (NO) e contagem de taquízoitos utilizou-se placas de cultura de 12 poços (K12-012 KASVI®).

6.5. Tratamento e infecção das células gliais

As culturas de células gliais foram tratadas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula* na concentração 12,5µg/mL por um período de 24 horas e 72 horas. Após o período de tratamento o meio foi retirado e realizada a infecção com taquízoitos de *N. caninum* pelo período de 72 horas. A infecção das células foi realizada como descrito por Pinheiro et al., (2006). Os taquízoitos de *N. caninum* foram purificados utilizando filtro de 5 µm (Millex®, Millipore), e contados em câmara de Neubauer. Utilizou-se uma relação célula/parasito de 1:1 para infecção das culturas. O experimento foi encerrado e realizado as diferentes análises de MTT, NO e quantificação de taquízoitos.

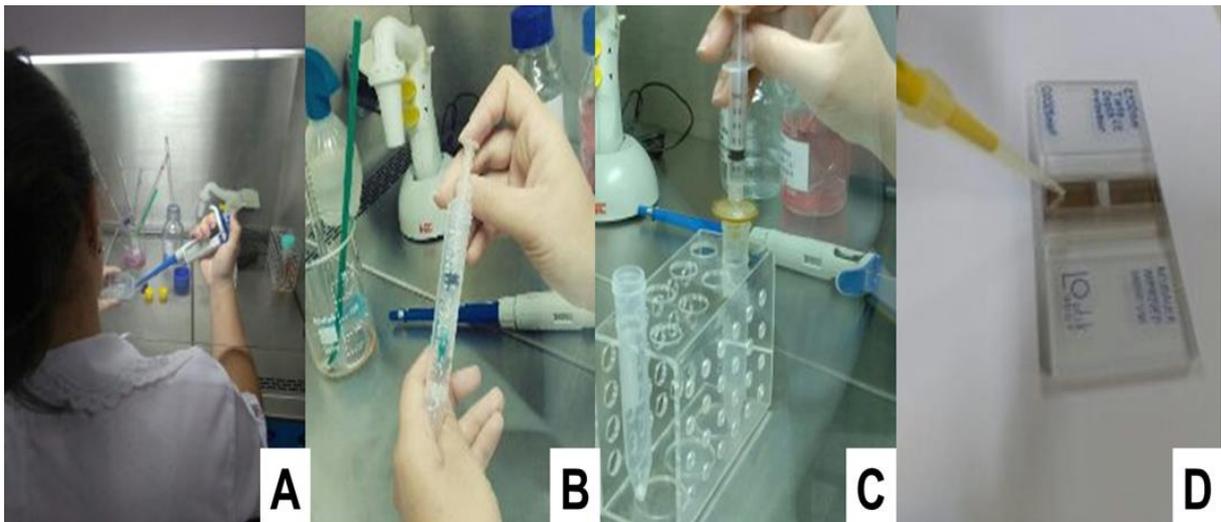


Figura 5: Purificação de taquizoítos de *N. caninum*. A. Coleta de taquizoítos das garrafas de cultivo; B. Passagem do concentrado de taquizoíto em seringa com agulha 22G; C. Filtração, em filtro de 5 µm (Millex®, Millipore); D. Preparo da câmara de Neubauer para contagem de taquizoítos. (Fotografias do arquivo pessoal).

6.6. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células gliais foi verificada pelo método de conversão do MTT [3 - (4,5 dimetiltiazol-2yl) - 2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo] em cristais de formazan (CARMICHAEL et al., 1987). Para o método de conversão do MTT em formazan foram adicionados 0,5 g/L de MTT (Amresco®, Solon, Ohio) nas culturas de células da glia. As culturas então foram incubadas em estufa com atmosfera úmida com 5% CO₂ a 37°C por 2 horas, após esse período adicionou-se 100µL do tampão de lise (20% de SDS e 50% de DMF) e a reação deixada *overnight* em temperatura ambiente. A leitura foi realizada utilizando leitora de Microplacas de ELISA - Expert Plus (ANALÍTICA®) no comprimento de onda de 580nm.

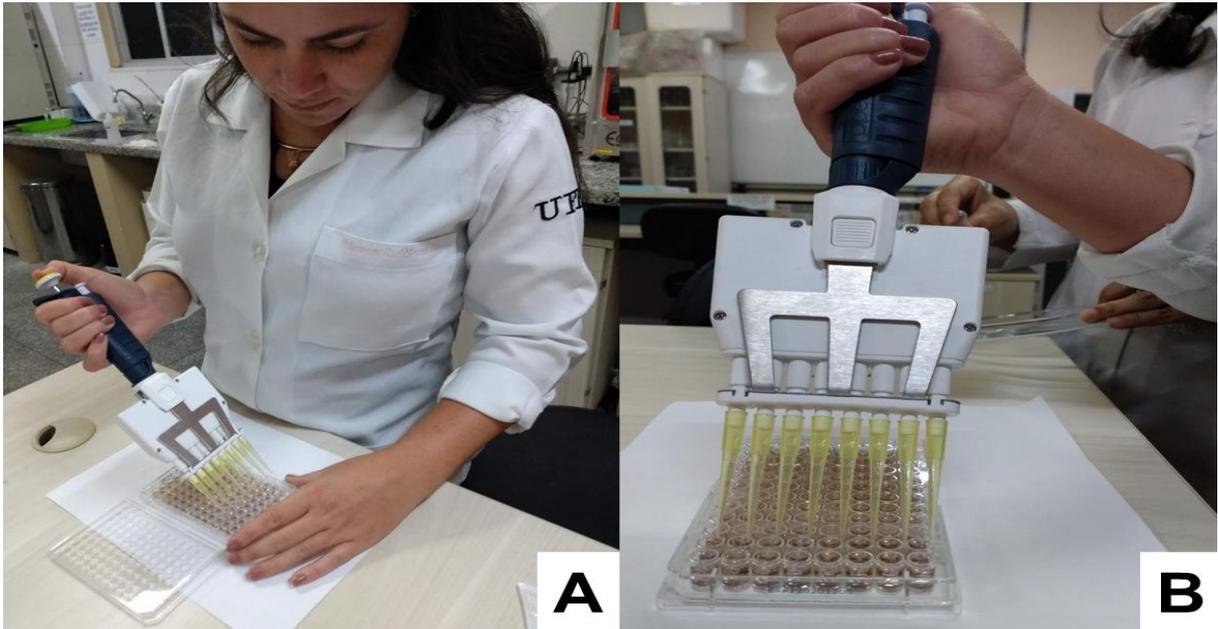


Figura 6: Método de conversão do MTT. A e B: Plaqueamento. (Fotografias do arquivo pessoal).

6.7. Dosagem de proteína

O teor de proteína das culturas foi determinado pelo método de Lowry et al., (1951) (Bio-Rad®, Hercules, CA). O sobrenadante das culturas foi retirado e o tapete celular lavado três vezes com PBS (1x). Lisadas em 2% (v/v) SDS, 2mM EGTA, 4 M de uréia, 0,5% (v/v) de Triton X-100, 62.5mM Tris -HCl (pH 6,8) suplementado com 0,1% (v/v) de inibidor de protease (Sigma®, St. Louis, MO). Construção da curva padrão e das amostras em triplicata, posteriormente foi adicionado 25 μ l do Reagente A' e 200 μ l do Reagente B, em cada poço. A leitura foi realizada em uma absorbância de 620nm usando um Leitor de Microplacas de ELISA (Expert Plus ANALÍTICA®). Os resultados foram expressos em μ g/ μ L.

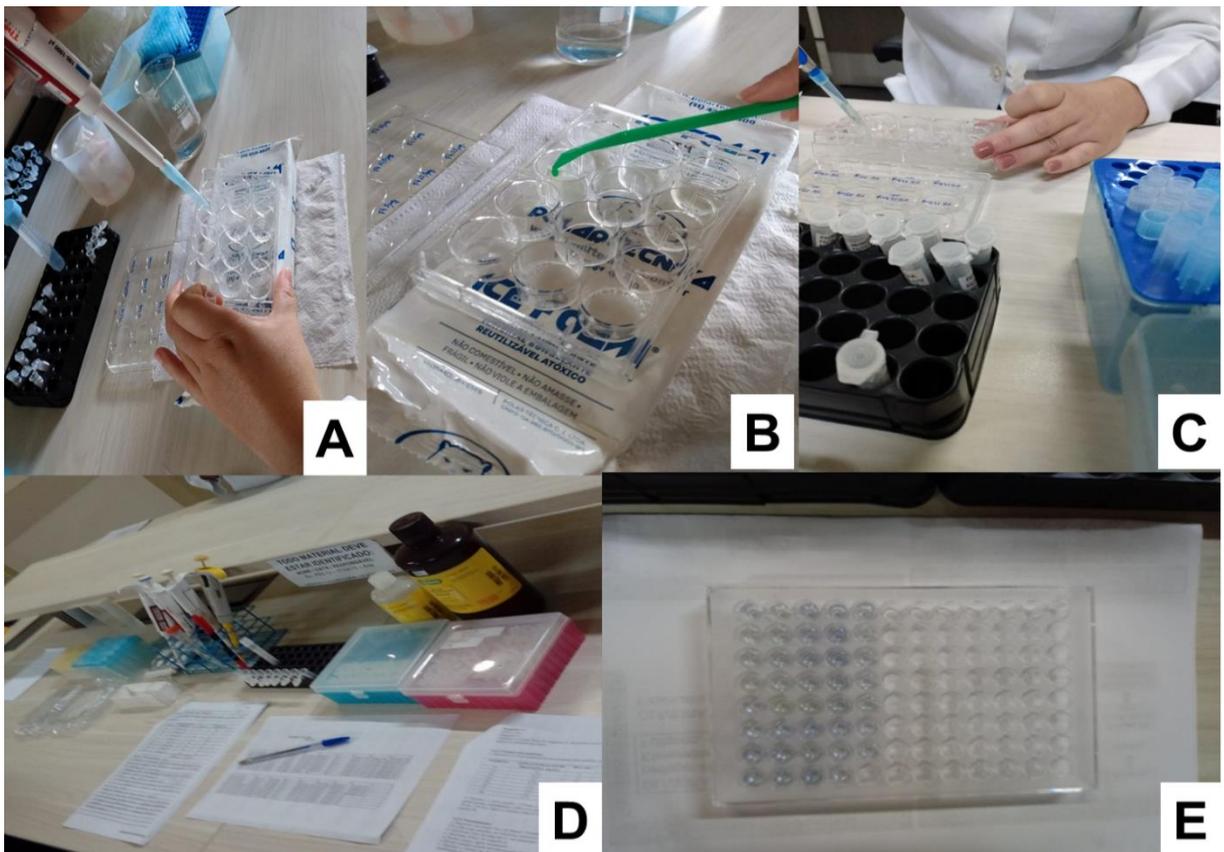


Figura 7: Dosagem de proteína. A. Lavagem do tapete celular, sobre banho de gelo; B. Passagem do screp para remoção do tapete; C. Coleta; D e E. Preparação de soluções e plaqueamento. (Fotografias do arquivo pessoal).

6.8. Dosagem de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) foi dosado no sobrenadante da cultura celular de acordo com o método de Griess (WON *et al.*, 2004). Após o período de tratamento e infecção, o meio de cultura foi recolhido e distribuído, em triplicata, em placa de 96 poços. Posteriormente adicionou-se solução de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de naftil-etilenediamina em 5 % de ácido fosfórico). Padrões quantitativos da curva padrão foram gerados em uma série de diluição pelo nitrito de sódio em meio de cultura. As análises foram feitas em triplicatas. A leitura foi realizada em Leitor de Microplacas de ELISA (Expert Plus ANALÍTICA®) no comprimento de onda de 490nm.

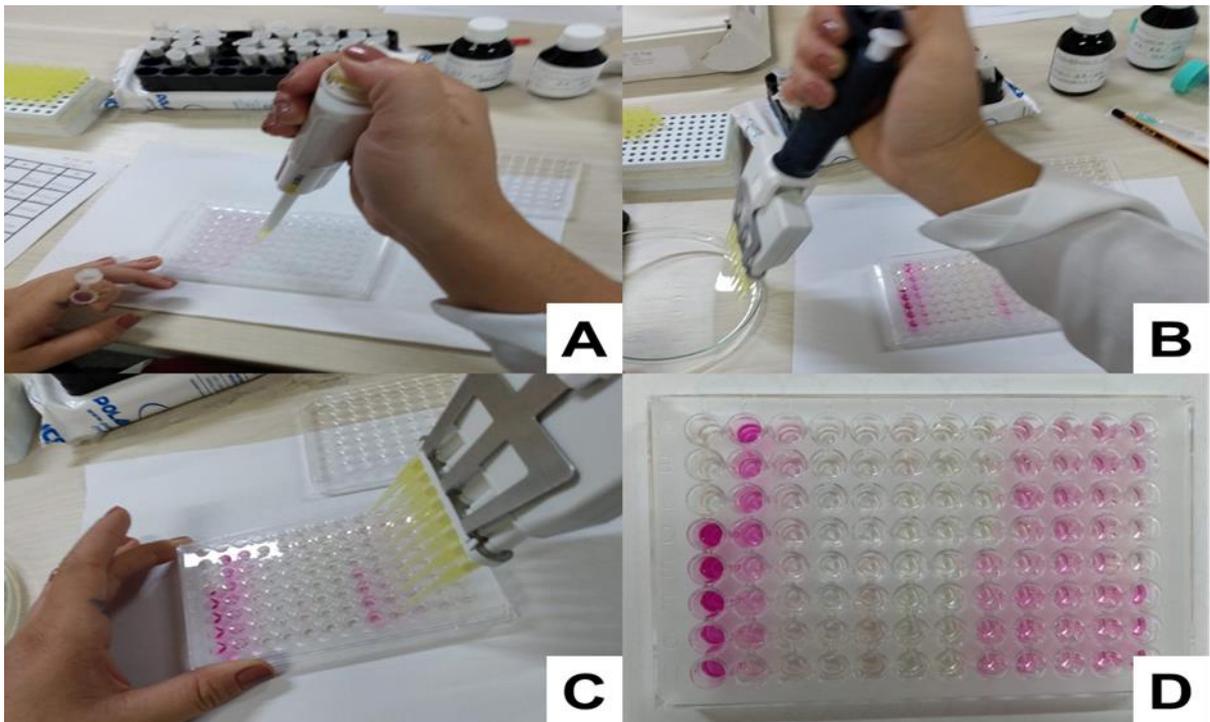


Figura 8: Dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess. A, B, C, D. Plaqueamento. (Fotografias do arquivo pessoal).

6.9. Contagem de parasito

Após 72 horas de infecção foi realizada a contagem dos parasitos das culturas infectadas com *N. caninum*. Os poços foram raspados com auxílio de *scrap* para liberar os parasitos do interior das células. O material foi coletado, passado 3x na seringa com agulha hipodérmica 21G1. A contagem foi realizada com auxílio da câmara de Neubauer.



Figura 9: Contagem de taquizoíto de *N. caninum*. A. Passagem do screp. B e C. Avaliação do volume total. (Fotografias do arquivo pessoal).

6.10. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5.0 Trial (California, EUA) e registrado com média \pm desvio padrão. Para determinar a diferença estatística ente os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA) com pós-teste Dunnet. Para a contagem de NC foi utilizado o teste “t” com pós-teste de Mann Whitney. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados com significância estatística. Para dados não paramétricos foi realizado teste de Kruskal-Wallis seguido do pós test Dunns. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste D’Agustino e Pearson. Para avaliar a diferença estatística dos dados paramétricos foi realizado o teste ANOVA One Way.

7. RESULTADOS

7.1. Efeito induzido pelo tratamento e infecção – MTT

O ensaio de MTT demonstrou que o tratamento por 24 horas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula* (12,5µg/mL) e, células infectadas com *N. caninum*, apresentou um aumento de 38% do metabolismo mitocondrial das células da glia, quando comparada com o grupo controle (*p=0,0121) (Figura 10). No tratamento por 72 horas, não foi observado aumento da viabilidade celular, comparadas com as células em condição controle, e sim a redução do metabolismo mitocondrial nas culturas de células da glia tratadas com a Fr5, quando comparadas com o NC (0,0159) (Figura 11).

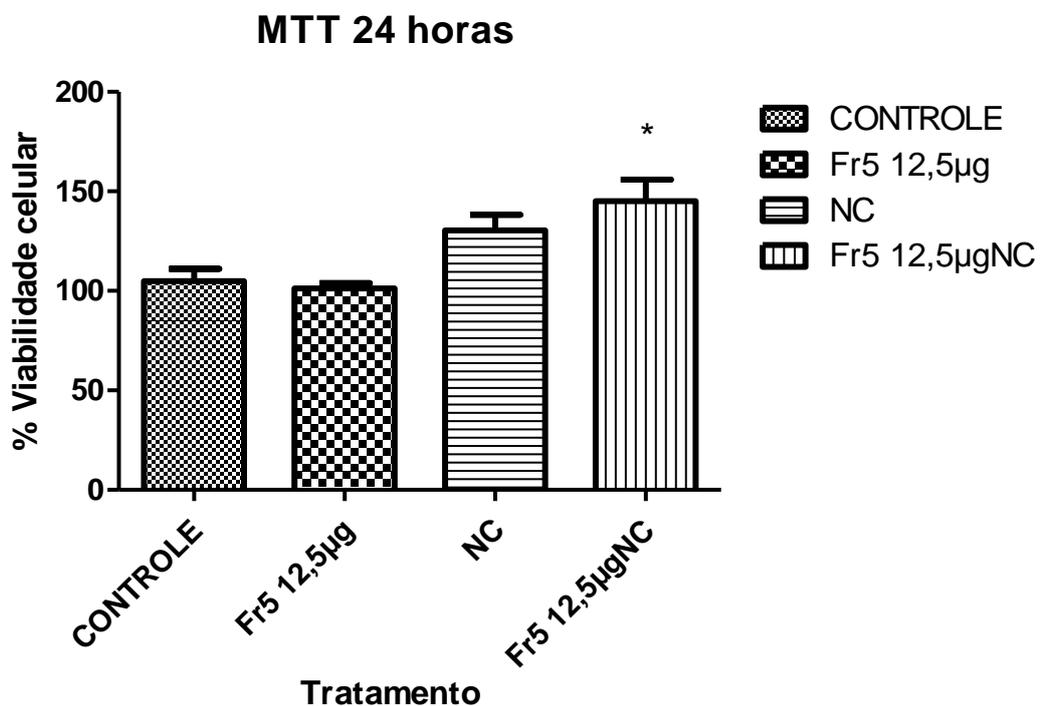


Figura 10. Análise do efeito da Fr5 (12,5µg/mL), na viabilidade de células gliais verificada através do teste de MTT. Resultados expressos em média ± SEM (n=4). (*) representa diferença estatística em relação ao grupo tratado com o controle, com valor de p<0,05. Testes estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's.

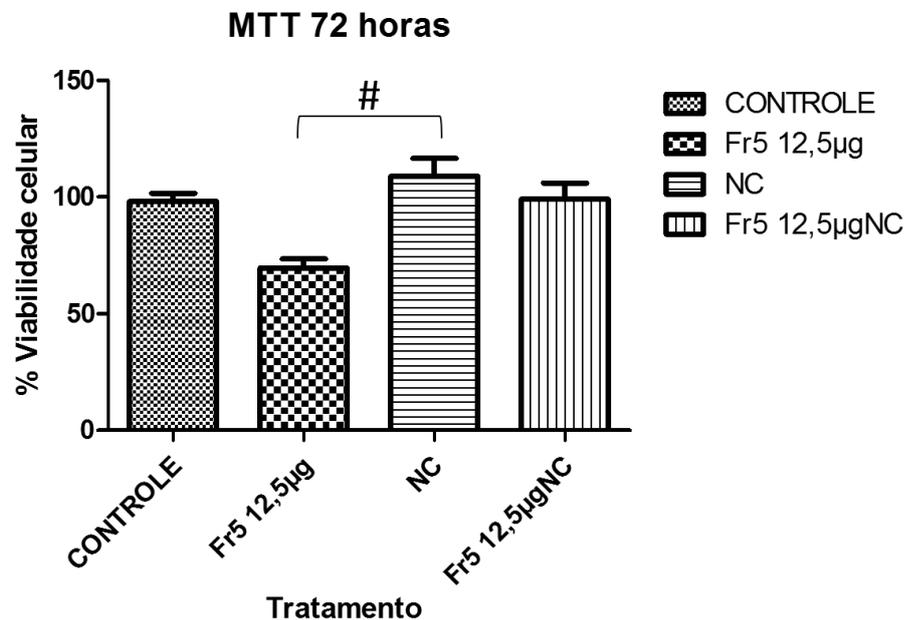


Figura 11. Análise do efeito da Fr5 (12,5µg/mL), na viabilidade de células glias verificada através do teste de MTT. Resultados expressos em média \pm SEM (n=4). Não houve significância estatística do grupo tratado comparada com o controle; (#) $p < 0,05$ comparada com o controle; (#) $p < 0,05$ comparada com as células infectadas (Nc). Testes estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's.

7.2. Produção de óxido nítrico

Foi observado no tratamento por 24 horas, que a Fr5 na concentração de (12,5µg/mL) levou a redução de NO, nas culturas tratadas com a fração e infectadas com *N. caninum*, quando comparadas com o grupo controle (** $p=0,0055$) (Figura 12). No tratamento por 72 horas a fração não alterou a produção de NO nas culturas tratadas em relação ao grupo em condição controle, ainda no tratamento por 72 horas observou-se no grupo infectado com *N. caninum* um aumento na produção de NO (** $p=0,0008$) (Figura 13).

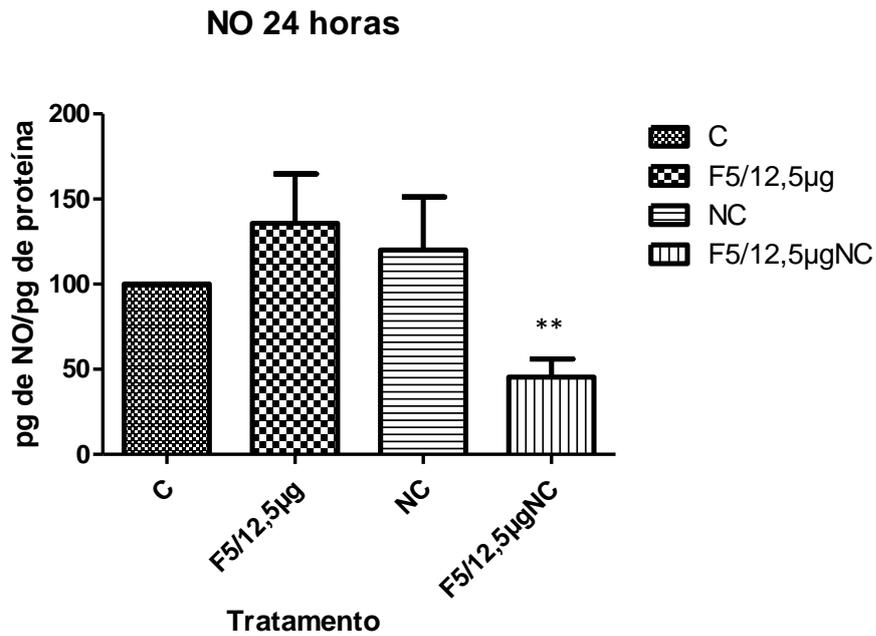


Figura 12. Dosagem de nitrito em cultura primária de células gliais tratadas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula* por 24h e infectadas com taquizoítos de *N. caninum*. Os dados são representados em média \pm SEM, (n=6), significância estatística mostrada como (**) $p < 0,01$ comparada com o controle. Testes estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's.

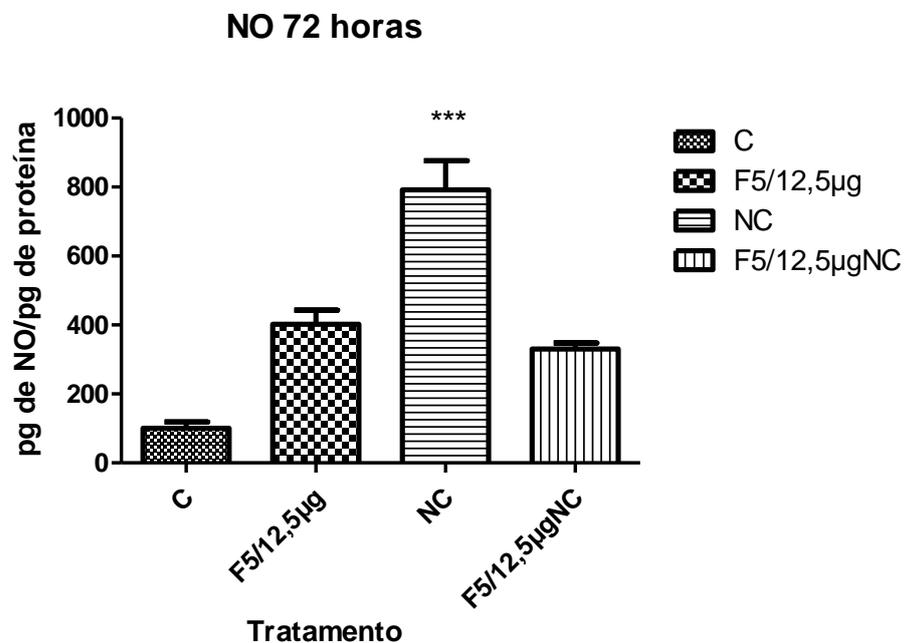


Figura 13. Dosagem de nitrito em cultura primária de células gliais tratadas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula* por 72h e infectadas com taquizoítos de *N. caninum*. Os dados são representados em média \pm SEM, (n=6), significância estatística mostrada como (***) $p < 0,001$ comparada com o controle. Testes estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's.

7.3. Determinação da proliferação parasitária

Após período de tratamento e de infecção, realizou-se a contagem de taquizoítos nas diferentes culturas. Verificou-se que os grupos tratados com a fração do mel de abelha *T. angustula* apresentaram uma redução de 31,07% na proliferação parasitária, para as culturas com tratamento por 24 horas (* $p=0,0133$) (Figura 14), e 63,07% (* $p=0,0284$) na cultura com tratamento por 72 horas (Figura 15).

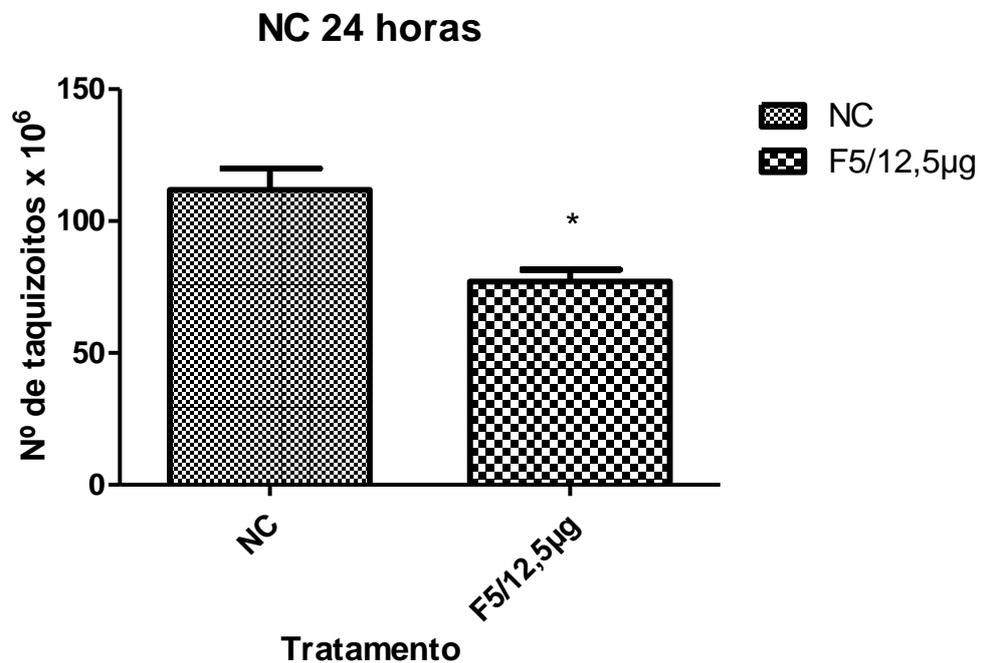


Figura 14. Quantificação de taquizoítos de *N. caninum* em cultura primária de células glias tratadas com a Fr5 do mel de abelha *T. angustula*, na concentração de (12,5µg/mL), por período de 24h e infectadas por 72h. Os dados são representados em mediana \pm SEM, (n=4), significância estatística mostrada como (*) $p < 0,05$ comparada com as células em condição controle. Testes estatísticos: Teste "t" com pós-teste Mann Whitney.

8. DISCUSSÃO

As células da glia desempenham funções fundamentais para manutenção da homeostase do cérebro, atuando sobre diversas situações, com a finalidade de manter a integridade do SNC, seja na desintoxicação, neuroproteção e resposta imune contra a substâncias tóxicas e agentes patogênicos (COYLE e SCHWARCZ, 2000; GINHOUX et al., 2013; MATIAS; MORGADO; GOMES, 2019). O SNC faz parte dos tecidos de predileção de *N. caninum*, e quando infectado, pode levar a inúmeras alterações neurológicas no indivíduo parasitado. Entretanto as células da glia possuem mecanismo de resposta frente à infecção por esse agente, o qual promove mudanças morfológicas e bioquímicas nestes componentes celulares, levando a liberação de mediadores químicos fundamentais para inibir e combater o parasito. No entanto uma resposta inflamatória desacerbada pode levar a um quadro crônico, evoluindo para morte celular (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2006; OTERI et al., 2019).

No presente trabalho foi demonstrado o efeito do tratamento prévio de uma fração do mel de abelha *T. angustula* em culturas de células da glia infectadas por taquizoítos de *N. caninum*, uma vez que o mel possui substâncias ativas capazes de promover respostas anti-inflamatórias, antioxidantes e imunomodulatória (ALVAREZ – SUARES, 2010; GONÇALVES, 2005; IRISH, 2006; TONKS, 2003; TONKS, 2007).

Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com a Fr5 por 24 horas, promoveu um efeito protetor às células gliais, aumentando a viabilidade celular em 40%, quando infectada com *N. caninum*. Os resultados encontrados no tratamento por 24 horas nos testes de MTT, podem estar associados ao aumento da estabilidade das membranas, e no aumento da disponibilidade energética às células, uma vez que o mel é composto por diferentes açúcares e substâncias ativas como os flavonoides (WESTON e BROCKLEBANK, 1999; MENDES et al., 2009; PENG et al., 2005).

Um estudo de Matos e colaboradores em 2014, investigou o efeito de flavonoides, em um modelo *in vitro* de infecção de *N. caninum* em culturas de células gliais, semelhante ao realizado neste trabalho. O estudo avaliou individualmente o efeito de 10 flavonoides diferentes e foi observado que todos os flavonoides testados induziram um aumento no metabolismo celular. Esses resultados corroboram com os achados deste trabalho.

Entretanto essa atividade não se mantém no tratamento por 72 horas pós infecção. Aparentemente no tratamento por 72 horas a Fr5, pode ter induzido um efeito tóxico, quando mantidas apenas com as células gliais. Muito provavelmente a redução da proliferação parasitária não foi devido ao NO, pois as culturas não apresentaram diferenças estatísticas na produção de NO após infecção.

Em vista da redução da proliferação parasitária em ambos tratamentos, sem que ocorresse alterações significativas nos níveis de NO, sugere-se que os flavonoides presentes na fração induziram a morte e inibição da proliferação de taquizoítos. Estudos *in vitro* com uso do mel demonstram seu potencial antimicrobiano, o sugere que o efeito inibitório induzido pelo mel no crescimento bacteriano, não se dá exclusivamente por um único fator, como por exemplo o efeito modulador no aumento da produção de NO, ou por seu efeito osmótico, mas por outros fatores, os quais seus mecanismos não são completamente esclarecidos (GONÇALVES, 2005; COOPER, MOLAN e HARDING, 2002).

Estudos com o uso da própolis demonstram a atividade antiprotozoário deste composto. Esta ação já foi demonstrada contra *Giardia lamblia*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas spp.* e *Toxoplasma gondii*, e pode estar relacionada com a sua ação imunomoduladora, atuando principalmente sobre a proliferação e aumento da motilidade de macrófagos, que são células fagocíticas, importantes no combate a infecções (PRYTZYK et al., 2003; DANTAS et al., 2006).

O tratamento com a Fr5 promoveu a redução nos níveis de NO de células infectadas, submetidas a tratamento por 24 e 72 horas. Enquanto, que para as culturas de células gliais infectadas com taquizoítos de *N. caninum*, por 72 horas, obtiveram um aumento na produção de NO. Este evento pode ser explicado nos estudos de Pinheiro e colaboradores (2006; 2010), que demonstraram a ativação das células gliais frente à infecção por *N. caninum* resulta na liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios, tais com o NO.

Onbas et al., (2016), avaliaram a atividades do extrato etanólico de própolis (EEP) na inibição de óxido nítrico em diferentes linhagens de células tumorais e notaram que as células tratadas nas concentrações de 25, 12,5 e 5 µg/mL apresentaram diminuição nos níveis de NO, o que pode contribuir nas atividades antiinflamatórias e imunorreguladoras. A capacidade dos flavonóides em inibir a produção de NO *in vitro* já foram relatadas em diversos estudos (SONG et al., 2002; BLONSKA et al., 2004; da SILVA et. al, 2015).

Em conjunto dos resultados a fração no tratamento por 24h horas promoveu uma redução de NO, com aumento de MTT, nas culturas infectadas com *N. caninum*, que levou a uma redução do número de parasito. No tratamento por 72 horas, não ocorreu alteração significativas nos níveis de NO e MTT nas culturas tratadas com a fração e infectadas com *N. caninum*, mas manteve a redução do número de parasito, a diminuição na quantificação de taquizoíto não se deve ao efeito de NO.

9. CONCLUSÃO

Diante desses resultados, sugere-se que a Fr5 do mel de abelha *T. angustula* reduziu o número de parasito nas culturas de células da glia de ratos infectados *in vitro* com taquizoítos de *N. caninum*. Contudo, estudos são necessários para melhor compreender quais os mecanismos envolvidos no controle da multiplicação parasitária.

REFERÊNCIAS

- ABREU, R. A.; WEISS, R. R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; LASKOSKI, L. M.; BERTOL, M. A. F.; KOCH, M. O.; ALBAN, S. M.; GREEN, K. T. Association of Antibodies against *Neospora caninum* in Mares with Reproductive Problems and Presence of Seropositive Dogs as a Risk Factor. **Veterinary Parasitology** 202:128-131. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.022>.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and phenolics of different types of honey. **Nutr. Res.**, v. 22, p. 1041-1047, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00406-2).
- 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. DOI: [10.1016/s0304-4017\(02\)00162-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00162-0).
- ALMERIA, F.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. **Research in Veterinary Science**, v. 30, p.1-7, 2013. DOI: [10.1016/j.rvsc.2013.04.008](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.008).
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; DÍAZ, D.; YADILEY ESTEVEZ, D.; ROMANDINI, S.; GIAMPIERI, F.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; BOMPADRE, S. BATTINO, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**. 48. 2490–2499. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>.
- ALVES, D. F. S.; CABRAL JÚNIOR, F. C.; CABRAL, P. P. A. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. M.; REGO, A. C. M.; MEDEIROS, A.C. Efeito da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.53, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912008000300010>.
- ATKINSON, R.; HARPER, P. A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today** 16: 110-114. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01604-X](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01604-X).
- AU, N. P. B.; MA, C. H. E. Recent advances in the study of bipolar/rod-shaped microglia and their roles in neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. MAY, p. 1–16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00128>.
- BARBER, J.S.; PAYNE-JOHNSON, C. E.; TREES; A. J. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. **Journal of Small Animal Practice**. 37, 568-574. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1996.tb02332.x>.
- BARTELS, C. J. M.; VAN SCHAİK, G.; VELDHUISEN, J. P.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; WOUDA, W.; DIJKSTRA, T. Effect of *Neospora caninum* serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated epidemics. **Preventive Veterinary Medicine**,

Amsterdã, v. 77, n. 3-4, p. 186-198, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.07.003>

BARTLEY, P. M.; KATZER, F.; ROCCHI, M. S.; MALEY, S. W.; BENAVIDES, J.; NATH, M.; PANG, Y.; CANTÓN, G.; THOMSON, J.; CHIANINI, INNES, E. A. Development of maternal and foetal immune responses in cattle following experimental challenge with *Neospora caninum* at day 210 of gestation. **Veterinary Research**, v.44, n.91, p. 1-14. 2013. DOI: 10.1186/1297-9716-44-91.

BEAR, M. F. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso** / MARK F BEAR; BARRY W. CONNORS E MICHACL A. Paradiso; coord, trad. Jorge Alberto Quilfeldt. let al.]. - 2.ed. - Porto Alegre: Artmed, 2002.

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. DOI: 10.1007/bf00942230.

BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. P.; SCHELLER, S.; KROL, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774 a.1 macrophages. **J Ethnopharmacol** 91:25–30, 2004.. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.011>.

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. DOI: 10.526/cab.v11i2.4585.

BOGDANOV, S. Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, n. 7, p. 748-753, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0259>.

BRAUTIGAM, F.E.; HIETALA, S.K.; GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande-MS. Anais... Campo Grande, **Associação Panamericana de Ciências Veterinária** 1996. p.284

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

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitol.**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02414-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02414-5).

CAMILLO, G.; CADORE, G.; CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; BRÄUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; F. VOGEL, F.S.F. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1511-1513, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000600033>.

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000100002>.

CARLOS, I. Z.; CARLI, C. B. A.; MAIA, D. C. G.; BENZATTI, F. P.; LOPES, F. C. M.; ROESE, F. M.; WATANABE, M.; MICHELETTI, A. C.; SANTOS, L. C. DOS; VILEGAS, W.; HONDA, N. K. Immunostimulatory effects of the phenolic compounds from lichens on nitric oxide and hydrogen peroxide production. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 4, p. 847-852, Dec. 2009.

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.

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. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19910108>.

COSTA, S.; PLANCHENAULT, 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. Mind glue: implications of glial cell biology for psychiatry. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 1, p. 90–93, 2000.

DA SILVA, R. O.; ANDRADE, V. M.; RÊGO, E. S. B.; DÓRIA, G. A. A.; DOS SANTOS LIMA, B.; DA SILVA, F. A.; DE SOUZA ARAÚJO, A. A.; DE ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C.; GOMES, M. Z. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **J Ethnopharmacol** 21(170):66–71, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.009>.

DANTAS, A.P.; OLIVIERI, B.P.; GOMES, F.H.M.; DE CASTRO, S.L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.187-193, 2006.

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. DOI: <https://doi.org/10.1006/fmic.1994.1058>.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A.N.D.A Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agente and experimental transmission. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 1-59, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01035-7).

DUBEY JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Vet. Parasitol.** 84: 349–367, 1999.

DUBEY J.P.; LINDSAY D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Research**, v.86, p.165-168. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004360050027>.

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. DOI: [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0345:COTOIO\]2.0.CO2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0345:COTOIO]2.0.CO2).

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int J Parasitol** 32, 929–946, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2).

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003. DOI: 10.3347/kjp.2003.41.1.1.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 267–289, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology e control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323 – 367, 2007. DOI: 10.1128/CMR.00031-06.

DUBEY, J. B.; SCHARES, G.; Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p. 90-108, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>.

ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A.; JOHNSON, A. M.. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, p. 303-311, 1994.

ETERAF-OSKOU EI, T.; NAJAFI, M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. **Iran J. Basic. Med. Sci.**, v.16, p. 731-742, 2013.

GINHOUX, F.; Lim S.; Hoeffel G.; Low D.; Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013 Apr 17;7:45. et al. Origin and differentiation of microglia. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. April, p. 1–14, 2013. DOI: [doi: 10.3389/fncel.2013.00045](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045).

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, n. 71-75, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00129-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00129-6).

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. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00493-9).

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 (2), 159-161p. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001>.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 247-252, 2006. DOI: [10.1016/j.pt.2006.03.008](https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.03.008).

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

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133–150, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>.

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. DOI: [10.1017/s0031182000084754](https://doi.org/10.1017/s0031182000084754).

HEMPHILL, A. The host – Parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, v. 43, p. 49-104. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.004>.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. An European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology** 30: 877-924. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00072-2).

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* and neosporosis – recente achievements in host and parasite cell biology and treatment. **Acta-Parasitologica**. Warszawa, Poland. v. 51, n. 1, p. 15-25. 2006. DOI: [10.3347/kjp.2003.41.1.1](https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1).

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, Cambridge University Press (CUP). [s.l.], v. 133, n. 03, p.261-278. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182006000485>.

INNES, E. A.; PANTON, 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. DOI: 10.1016/s0021-9975(05)80075-1.

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. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02372-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02372-3).

IRISH, M.; CARTER, D. A.; SHOKOHI, T.; BLAIR, S. E. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. **Med. Mycol.**, v.44, p. 289-291, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/13693780500417037>.

JENKINS, M; WOUDA, W; DUBEY J.P. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 4: 270–274. 1997.

JHA, M. K.; Kim, J. H.; Song, G.J.; Lee, W. H.; Lee, I. K.; Lee, H. W. An, S. S. A.; Kim, S.; Suk, K. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: Implications in brain health and diseases. **Progress in Neurobiology**, v. 162, p. 37–69, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.12.003>.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 150, 167-168, 2013.

KENJERIC, D.; MANDIC, M. L.; PRIMORAC, L.; BUBALO, D.; PERL, A. Flavonoid profile of *Robinia* honeys produced in Croatia. **Food Chemistry**, v. 102, p. 683-690, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.05.055.

KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; FONSEKA, S.; KASPER, L. H. *Neospora caninum*: Role for Immune Cytokines in Host Immunity. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.24-34, jan. 1997. Elsevier BV. DOI: 10.1006/expr.1996.4110.

KHAN, F. R.; ABADIN, Z. U. L.; RAUF N.; Honey: nutritional and medicinal value. **Intern J Clin Practice**, 61, n 10, 1705–1707p, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01417.x>.

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**, 40, n 8, 945-950p. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.008>.

LIANDA, R.L.P.; CASTRO, R.N. Isolamento e identificação da *Morina* em Mel Brasileiro de *Apis mellifera*. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1472-5, 2008.

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. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04904.x.

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, 2001. DOI: 10.1645/0022-3395(2001)087[0909:OEIDFM]2.0.CO;2.

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

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. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00145.x>.

MATIAS, I.; MORGADO, J.; GOMES, F. C. A. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, n. March, p. 1–18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>.

MATOS, R. B.; BRAGA-DE-SOUZA, S.; PITANGA, B. P.; SILVA, V. D.; JESUS, E. E.; PINHEIRO, A. M.; COSTA, M. D.; SANTOS EL-BACHA, R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. S.; COSTA, S. L. Flavonoids modulate the proliferation of *Neospora caninum* in glial cell primary cultures. **The Korean journal of parasitology**, 52(6), 613–619, 2014. DOI:10.3347/kjp.2014.52.6.613.

MAVRIC, E.; WITTMANN, S.; BARTH, G.; HENLE, T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **Mol Nutr Foods Res**.52 : 483–489, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700282>.

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. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00138-6).

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

MONNEY, T.; HEMPHILL, A.; Vaccines against neosporosis: What can we learn from the past studies. **Experimental Parasitology**, v.140, p. 52-70, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.015>.

MOURA, A. B.; SILVA, M. O.; FARIAS, J. A.; NETO, A. V.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; FONTEQUE, J. H.; BUNN, S. Anticorpos contra *Neospora* spp em equinos de duas regiões geográficas do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22: 443-456. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900004>.

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

NORENBERG, M. D.; 1994 Astrocyte responses to CNS injury. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 53, 213-220p. <https://doi.org/10.1097/00005072-199405000-00001>.

OLUDE, M. A.; MUSTAPHA, O. A.; ADEROUNMU, O. A.; OLOPADE, J. O.; IHUNWO, A. O. Astrocyte morphology, heterogeneity, and density in the developing African giant rat (*Cricetomys gambianus*). **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. May, p. 1–10, 2015. DOI: 10.3389 / fnana.2015.00067.

ONBAS, R.; KAZAN, A.; NALBANTSOY, A.; YESIL-CELIK TAS, O. Cytotoxic and Nitric Oxide Inhibition Activities of Propolis Extract along with Microencapsulation by Complex Coacervation. **Plant Foods Hum Nutr.** Volume 71, Issue 3, pp 286–293, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0558-1>.

OTERI, G.; LENTINI, M.; CICCÌ, M.; PEDITTO, M.; REY, E.O.; CARRIÓN, A. B.; MARCIANO, A. Role of Antioxidants in Minor Salivary Glands Cancer in the Elderly. **Journal of Craniofacial Surgery.** 30 (3): 823-8. 2019.

PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A.; LOOMIS, E. F.; ROWE, J. D.; ANDERSON, M. L.; MARSH, A. E.; CRAY, C.; BARR, B. C. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: Development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** 467–473. 1998.

PACKHAM, A.E.; CONRAD, P. A.; WILSON, W. D.; JEANES, L. V.; SVERLOW, K. W.; GARDNER, I. A.; DAFT, B. M.; MARSH, A. E.; BLAGBURN, B. L.; FERRARO, G. L.; BARR, B. C. qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. **Journal of Parasitology. American Society of Parasitologists.** 88(6) p. 1239–1246. 2002.

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.

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, 2001. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00221-1.

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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.05.006>.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; RIBEIRO, C. S. O.; TARDY, M.; EL-BACHÁ, R. D. S.; COSTA, M.D.F.D. *Neospora caninum*: Early immune response of rat mixed glial cultures after tachyzoites infection. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 4, p. 442–447, 2010. DOI:10.1016/j.exppara.2009.12.018.

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. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.2523>.

PRYTZYK E.; DANTAS A. P.; SALOMÃO K.; PEREIRA A. S.; BANKOVA V. S.; DE CASTRO S. L.; AQUINO F. R. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **J Ethnopharmacol** 88: 189-193, 2003.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, A. M.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J.T.; What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 133-142, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>.

SAIJO, K.; GLASS, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 775–787, 2011. DOI: [doi: 10.1038/nri3086](https://doi.org/10.1038/nri3086).

SILVA, C.L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterização físicoquímica 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.

SONG, Y. S.; PARK, E-H.; HUR, G. M.; RYU, Y.S.; KIM, Y.M.; JIN, C. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **J Ethnopharmacol**, 80:155–161, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00023-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00023-5).

SOSUNOV, A. A.; WU, X.; TSANKOVA, N. M.; GUILFOYLE, E.; MCKHANN, G. M.; GOLDMAN, J. E. PHENOTYPIC HETEROGENEITY AND Plasticity of Isocortical and Hippocampal Astrocytes in the Human Brain. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 2285–2298, 2014. DOI: [10.1523/jneurosci.4037-13.2014](https://doi.org/10.1523/jneurosci.4037-13.2014).

SPEER C. A.; DUBEY, J. P.; McALLISTER M. M.; BLIXT, J. A. Comparative ultrastructure of tachyzoites bradyzoites na tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal Parasitology**, v. 29, n. 10 p. 1509-1519, , 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00132-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00132-0).

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. DOI [10.1007/s11064-012-0798-x](https://doi.org/10.1007/s11064-012-0798-x).

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Prog Neurobiol**, v. 57, n. 6, p. 563-81, Apr 1999. ISSN 0301-0082. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00069-0).

TAUBERT, A.; ZAHNER, H.; HERMOSILLA, C. Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian

paradies. **Veterinary Parasitology**, 142, 214-222p. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.021>.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B. S.; ANKLAM, E. HPLC Flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 485–496, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.836>.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. DE. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm**, Florianópolis,15(1): 115-21. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S010407072006000100014>.

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. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1043-4666\(03\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S1043-4666(03)00092-9).

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. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1106683>.

VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; SCHARES, G.; VON BLUMRODER, D.; CONRATHS, F. J.; NORTON, R.; WILLIAMS, D. J.; ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A.; MATTSSON, J. G.; BJORKMAN, C.; FERNANDEZ-GARCIA, A.; ORTEGA-MORA, L. M.; MULLER, N.; SAGER, H.; HEMPHILL, A. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology** 126:351-64. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.016>.

VONLAUFEN, N.; GIANINAZZI, C.; MÜLLER, N.; SIMON, F.; BJÖRKMAN, C.; JUNGI, T.W.; LEIB, S. L.; HEMPHILL, A. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Neospora caninum*: an alternative approach to study host-parasite interactions. **Int J Parasitol.** 32: 533-542, 2002. [10.1016/S0020-7519\(01\)00351-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00351-4). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00351-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00351-4).

WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, L. K. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. **Food Chem.** 64, 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. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00162-X).

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. DOI: [10.1128/IAI.00777-06](https://doi.org/10.1128/IAI.00777-06).

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.

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. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00105-8).

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. DOI:10.1292/jvms.62.347.