

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

**EFEITOS DA PRÓPOLIS EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS
INFECTADAS COM *Neospora caninum***

BIANCA PEREIRA DA SILVA SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
AGOSTO – 2015**

**EFEITOS DA PRÓPOLIS EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS
INFECTADAS COM *Neospora caninum***

BIANCA PEREIRA DA SILVA SANTOS

Bacharel em Ciências Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
2013

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

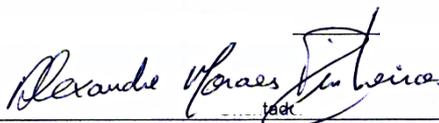
**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
AGOSTO – 2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

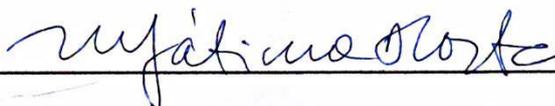
S237e	<p>Santos, Bianca Pereira da Silva. Efeitos da própolis em culturas de astrócitos infectadas com <i>Neospora caninum</i> / Bianca Pereira da Silva Santos. – Cruz das Almas, BA, 2015. 63f.; il.</p> <p>Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Parasitologia veterinária – Neosporose. 2.Própolis – Combate a doenças. 3.Astrócitos – Rato como animal de laboratório. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 636.39082</p>
-------	---

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

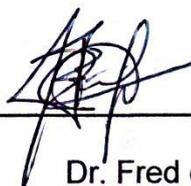
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
BIANCA PEREIRA DA SILVA SANTOS**



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



**Dr.ª Maria de Fátima Dias Costa
Universidade Federal da Bahia**



**Dr. Fred da Silva Julião
Instituto Federal Baiano**

**CRUZ DAS ALMAS – BA
AGOSTO - 2015**

“Os que desprezam os pequenos acontecimentos nunca farão grandes descobertas. Pequenos momentos mudam grandes rotas.”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força e equilíbrio,

A minha família, por todo apoio, amor e dedicação. De forma especial aos meus pais Adilson e Neuza, sempre me incentivando! Aos meus irmãos Bruna, Leticia e Iuri, por estarem ao meu lado em todos os momentos,

A Tiago, pelo companheirismo e compreensão,

As minhas amigas Camila e Allana, pelo apoio e incentivo,

Ao meu orientador Alexandre Moraes Pinheiro, por todo o apoio, dedicação e ensinamentos transmitidos, pela sua disposição em ajudar, sempre que precisei,

A amiga e colega de mestrado, Mel, por compartilhar várias experiências durante esse período,

A todos os colegas do mestrado,

As meninas do “N5”, Diana, Carol, Luciana, Cíntia, Inês, Lilian, Sandra, Hanna, Juliana e Kêu, pela troca de conhecimentos e contribuição,

Aos técnicos da UFRB, Ângela e Rodrigo,

Ao Núcleo de Estudo dos Insetos – INSECTA –UFRB, por ter cedido a própolis utilizado no experimento,

Ao Biotério da UEFS, por ter cedido os animais,

A Prof^a Maria de Fátima e a todo pessoal do Laboratório de Neuroquímica da UFBA, em especial, Help, Isabela, Bianca, Vanessa, Lívia, Felipe e Alessandra,

A CAPES por ter concedido a bolsa de pós-graduação,

A todas as que pessoas que, de diversas formas, contribuíram para a realização deste trabalho, ficam meus sinceros agradecimentos,

Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. <i>Neospora caninum</i>	15
2.1.2. Ciclo biológico e hospedeiros	15
2.2. Sistema Nervoso Central	20
2.2.1 Astrócitos	23
2.3. Resposta Imune	25
2.4. Própolis	27
2.4.1. Caracterização e histórico da própolis	27
2.4.2. Utilização e propriedades terapêuticas da própolis	29
Referências bibliográficas	34
Capítulo 1	
EFEITOS DA PRÓPOLIS EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS INFECTADAS COM <i>Neospora caninum</i>	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
ANEXOS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do protozoário <i>Neospora caninum</i> adaptado de Ellis, 2010.....	17
Figura 2. Taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> em cultivo de células VERO.....	18
Figura 3. Células do SNC: Oligodendrócito, micróglia, astrócito, neurônio e célula endimária.....	21
Figura 4. Fotomicrografias de corte histológico de cérebro de rato marcado com anticorpo anti GFAP com imuno-histoquímica contra a proteína ácida fibrilar glial (GFAP). A – astrócito protoplasmático, B – astrócito fibroso http://www.wesapiens.org/	23

CAPITULO 1

Figura 1. Atividade da lactato desidrogenase no sobrenadante das culturas de astrocitos. A: controle; B: tratadas com 0,1% de própolis; C: culturas infectadas com <i>N. caninum</i> e D: tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com <i>N. caninum</i> . *p<0,05	51
Figura 2. Dosagem de MTT nas culturas de astrocitos. A: controle; B: tratadas com 0,1% de própolis; C: culturas infectadas com <i>N. caninum</i> e D: tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com <i>N. caninu</i>	52
Figura 3. Total de taquizoítos utilizados na infecção (1) e 72h após a infecção (2), A - culturas infectadas com <i>N. caninum</i> ; B - culturas tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com <i>N. caninum</i> *p<0.05.....	52
Figura 4 - Produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas. A: controle; B: tratadas com 0,1% de própolis; C: culturas infectadas com <i>N. caninum</i> e D:	

tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum*.....53

Figura 5 – Imunocitoquímica de astrócitos A e B- controle; C- infectadas com *N. caninum*; D- tratadas com 0,1% de própolis e E – tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum*.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

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

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

Células NK – Células exterminadoras naturais (do inglês Natural Killer Cell)

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

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

SNC – Sistema Nervoso Central

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

T_H – T “*helper*”

EFEITOS DA PRÓPOLIS EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS INFECTADAS COM *Neospora caninum*

Autor: Bianca Pereira da Silva Santos

Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro

Resumo: A neosporose, uma patologia causada por *Neospora caninum*, provoca alterações reprodutivas em rebanhos bovinos e transtornos neuromusculares em cães. O parasito infecta e causa lesões em diversos tecidos do hospedeiro, apresentando um tropismo pelo Sistema Nervoso Central (SNC). Não existe nenhum tratamento para a neosporose, no entanto diversos trabalhos vêm sendo realizados utilizando-se a própolis, devido as suas ações farmacológicas, entre elas antiprotozoária. Deste modo, objetivou-se com esse trabalho, avaliar a ação modulatória da própolis em culturas de astrócitos de rato infectadas *in vitro* com *N. caninum*. Culturas primárias de astrócitos de ratos neonatos foram tratadas com 0,1% de própolis a partir do 16º dia após o cultivo e infectados com taquizoítos de *N. caninum*, da cepa NC-Bahia, no 20º dia de cultura. Após 60h de infecção foram realizados testes a fim de verificar o metabolismo mitocondrial, a atividade da lactato desidrogenase (LDH), produção de óxido nítrico e o número total de parasitos. Nas culturas tratadas com 0,1% de própolis observou-se uma redução significativa no de parasitos, além de aumento no metabolismo mitocondrial, na estabilidade das membranas e uma elevada produção de óxido nítrico nas culturas tratadas e infectadas. Sugerindo dessa forma, que a própolis pode exercer um papel antiprotozoário contra *N. caninum*.

Palavras-chave: Neosporose, SNC, Células gliais, Produto natural

EFFECTS OF PROPOLIS IN ASTROCYTE CULTURES INFECTED WITH *Neospora caninum*

Autor: Bianca Pereira da Silva Santos

Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro

Abstract: The neosporosis, a disease caused by *Neospora caninum* causes reproductive changes in cattle herds and neuromuscular disorders in dogs. The parasite infects and causes lesions in various tissues of the host, with a tropism for the central nervous system (CNS). There is no treatment for neosporosis, however several studies have been conducted using propolis because of its pharmacological actions, including antiprotozoa. Thus, the aim with this study was to evaluate the modulatory action of propolis in rat astrocytes *in vitro* cultures infected with *N. caninum*. Primary cultures of neonatal rat astrocytes were treated with 0.1% propolis from the 16th day after cultivation and infected with tachyzoites of *N. caninum* strain NC-Bahia, the 20th day of culture. After 60h of infection tests were conducted in order to ascertain mitochondrial metabolism, the activity of lactate dehydrogenase (LDH), nitric oxide production and the total number of parasites. In cultures treated with 0.1% propolis we observed a significant reduction in parasite, and an increase in mitochondrial metabolism in the stability of the membranes and a high production of nitric oxide in the treated and infected cultures. Suggesting thereby that propolis may play a role antiprotozoan against *N. caninum*.

Key words: Neosporosis, CNS, glial cells, natural product

1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma patologia que causa grande impacto econômico no setor agropecuário por ser considerada uma das principais causas de abortamento em bovinos (SARTOR et al., 2005). Langoni, et al. (2013), concluíram em seu trabalho que a neosporose bovina tem implicações negativas sobre os parâmetros reprodutivos de bovinos leiteiros causando retorno ao cio e abortamento, sobretudo no primeiro trimestre da gestação.

Esta doença é causada por *Neospora caninum*, um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Este protozoário é capaz de infectar várias espécies animais, como canídeos domésticos e selvagens, bovinos, equídeos e caprinos (DUBEY 2003; ADREOTTI 2010; VARASCHIN et al. 2012; MESQUITA et al. 2013). Além de causar alterações reprodutivas em rebanhos bovinos (ANDERSON et al. 1991) a neosporose, também está associada a transtornos neuromusculares e morte em cães (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Diversos trabalhos (PARISH et al.,1987; DUBEY et al., 1988^a; DUBEY et al., 1990) relatam o tropismo deste protozoário pelo Sistema Nervoso Central (SNC), que é formado por neurônios e células gliais. Essas últimas dividem-se em macroglia (oligodendrócitos e astrócitos) e microglia. Os astrócitos e a microglia são as duas principais populações de células reativas a danos neuronais e as alterações no microambiente cerebral (STREIT, WALTER; PENNELL, 1999). Os astrócitos constituem aproximadamente 90% do total de células presentes no SNC e contribuem para homeostasia cerebral, garantindo a manutenção extracelular de potássio, regulando a liberação de neurotransmissores, participando da formação da barreira hemato-encefálica, liberando fatores de crescimento ou regulando a resposta imune no cérebro (GEE; KELLER, 2005;

BAETEN; AKASSOGLU, 2011). Essa resposta imune nesse complexo sistema frente à infecção é essencial para elucidar os mecanismos de defesa.

A defesa celular é a principal resposta contra infecções provocadas por parasitos protozoários intracelulares. Desta forma o conhecimento sobre a resposta imunitária à infecção por *N. caninum* é necessário para compreender os mecanismos desta doença e estabelecer estratégias de controle (ANDERSON, ADRIANARIVO; CONRAD, 2000). Cada vez mais vem-se utilizando produtos naturais no combate a diversas patologias. Neste sentido, diversas pesquisas sobre produtos naturais são realizadas, com o objetivo de detectar e caracterizar compostos químicos com propriedades terapêuticas. (GONÇALVES et al., 2005).

A própolis é um dos principais produtos das abelhas, sendo reconhecido atualmente como um produto muito útil, tanto na medicina humana quanto na veterinária (ÖZAN et al., 2007). Trata-se de uma substância resinosa, de composição complexa e aroma característico, cuja cor varia entre amarelada, esverdeada clara, vermelha e marrom escuro, dependendo de sua origem botânica e idade (FRANCO; KUREBAYASHI, 1986; PARK et al., 2002; ADELMANN, 2005). A própolis caracteriza-se por ser uma complexa mistura de substâncias, utilizada pelas abelhas para vedar a colmeia. (LONGHINI et al., 2007). Por apresentar uma grande variedade de substâncias em sua composição química, a própolis desenvolve várias ações farmacológicas, dentre elas as ações, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, antifúngica e antiprotozoário. (LONGHINI et al., 2007; ODA et al., 2011). Desta forma objetiva-se com este estudo, avaliar a ação modulatória da própolis em culturas de astrócitos de rato infectadas *in vitro* com *Neospora caninum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Neospora caninum*

O *N. caninum* é um protozoário de parasitismo intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae. O gênero *Neospora* compreende duas espécies, *N. caninum* (DUBEY et al., 1988a), isolado de cérebro de cão e *N. hughesi* (DUBEY et al., 2001). As primeiras evidências de infecção por *N. caninum*, foram relatadas por Bjerkas et al (1984), na Noruega, quando observaram em cães com distúrbios neurológicos, a presença de cistos, que diferiam morfológicamente dos cistos formados por *Toxoplasma gondii*, além disso os animais também eram soronegativos para este parasito. Análises realizadas por microscopia eletrônica, mostraram diferenças ultra-estruturais significativas entre o protozoário desconhecido e *T. gondii* (BJERKÅS; PRESTHUS, 1988)

Em 1988, ao estudarem cortes histológicos de cães, Dubey e colaboradores, constataram que se tratava de uma nova espécie de protozoário e denominaram esta nova espécie de *Neospora caninum*. Posteriormente, foram desenvolvidos ensaios sorológicos e imunoistoquímicos afim de auxiliar no diagnóstico diferencial das infecções causadas por *N. caninum* e *T. gondii* (DUBEY et al., 1988b; LINDSAY; DUBEY, 1989).

2.1.2. Ciclo biológico e hospedeiros

A família Sarcocystidae tem como característica, a presença de ciclos biológicos heteróxenos. A replicação assexuada pode ocorrer em todos os animais homeotermos, já a reprodução sexuada ocorre apenas nos canídeos

(GONDIM et al., 2004), os quais também podem se comportar como hospedeiros intermediários do parasito.

O ciclo biológico de *N. caninum* (Figura 1) possui três estágios parasitários de infecção: taquizoítos, cistos que contém os bradizoítos e os oocistos com os esporozoítos (DUBEY et al., 2002). Os cistos teciduais, que são encontrados principalmente nas células do sistema nervoso central, possuem forma arredondada ou oval e medem até 107µm de comprimento, possuem parede lisa, com espessura de 4µm (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Os oocistos são a forma eliminada pelo hospedeiro definitivo, enquanto os taquizoítos caracterizam-se pela rápida multiplicação na célula hospedeira, promovendo lesões teciduais (McALLISTER et al., 1998).

Taquizoítos e bradizoítos podem ocorrer nos tecidos dos hospedeiros infectados sejam eles intermediários ou definitivos, já os esporozoítos estão presentes em oocistos sendo estes excretados nas fezes dos hospedeiros definitivos. Os taquizoítos dividem-se rapidamente dentro das células podendo infectar diversos tipos celulares como: as do sistema nervoso, as do endotélio vascular, os fibroblastos, os macrófagos, os micóticos, as do epitélio dos túbulos renais e os hepatócitos (DUBEY, 1988a; SPEER & DUBEY, 1989; DUBEY, et al., 2002). São encontradas principalmente no cérebro, em seguida coração e com menor incidência nos demais órgãos (WOUDA et al., 1997).

Os bradizoítos multiplicam-se lentamente e estão presentes em grande número dentro de cistos teciduais, entre 20 e 100, com tamanho aproximado de 8 x 2µm. Têm um menor número de rotrias quando comparados com os taquizoítos, (DUBEY; LINDSAY, 1996; SPEER et al., 1999). Corresponde à forma evolutiva encontrada durante a fase latente da infecção, em que o parasito se multiplica lentamente devido ao desencadeamento da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (HEMPHILL et al., 2006).

O hospedeiro definitivo de *N. caninum* elimina oocistos não esporulados. No ambiente, estes oocistos esporulam de 24 a 72 horas, contém dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos, (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999). Os esporozoítos representam um estágio infectante e resulta da replicação assexuada do agente no meio ambiente (DUBEY et al., 2002). Uma vez esporulados no meio ambiente esses oocistos são ingeridos pelo

hospedeiro intermediário e os esporozoítos invadem as células no trato intestinal, eles atravessam o epitélio, atingindo vasos sanguíneos e linfáticos, além de parasitarem outras células, como linfócitos e macrófagos. (LINDSAY et al., 1999; DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2006).

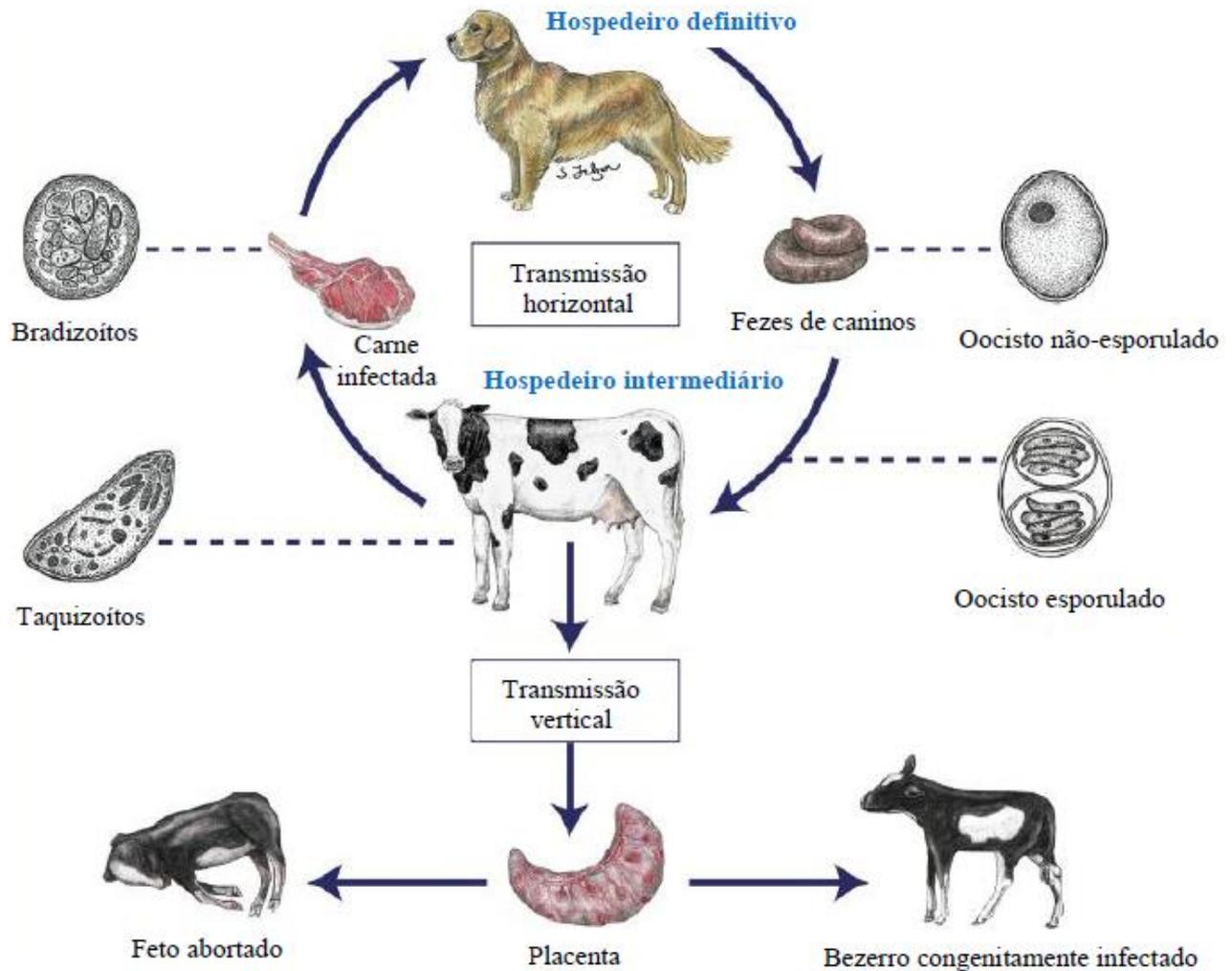


Figura 1. Ciclo biológico do protozoário *Neospora caninum*; Adaptado de Ellis, 2010

Na fase inicial da infecção os esporozoítos se disseminam por todo o corpo, após isso transformam-se em taquizoítos, provocando lesões teciduais e propagando a infecção para diversos tecidos do hospedeiro. (LINDSAY et al., 1999; DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2006). Os taquizoítos (Figura 2) se multiplicam por endodiogenia, processo de brotamento interno onde duas células-filhas são formadas dentro da célula-mãe, sendo liberadas após ruptura. Originando várias centenas de taquizoítos em poucos dias após a infecção, isso acarreta uma expansão do vacúolo, levando ao rompimento celular. Após o rompimento da célula os taquizoítos livres, infectam as células adjacentes iniciando todo o processo novamente, o que leva à uma expressiva destruição celular, e lesões significativas (HEMPHILL E GOTTSTEIN, 2006; COSTA et al., 2007).

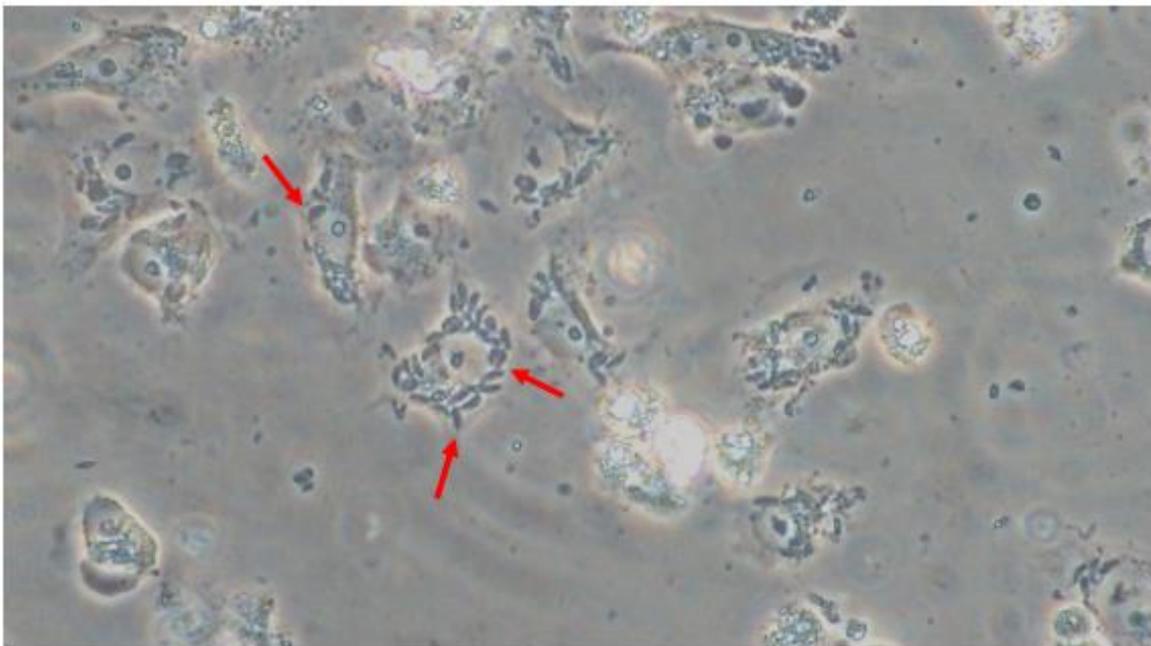


Figura 2. Taquizoítos de *Neospora caninum* em cultivo de células VERO (setas). Aumento de 400X. Arquivo pessoal.

A transmissão da neosporose pode ocorrer de duas formas: através da transmissão horizontal ou vertical. A transmissão horizontal se dá através da ingestão de água ou alimentos contaminados, quando o animal ingere cistos presentes nos tecidos de presas ou oocistos contidos na água e alimentos, tanto os cistos quanto os oocistos, após serem ingeridos e sofrerem digestão química e

enzimática após passagem pelo estômago e duodeno, respectivamente, liberam as formas infectantes para a luz do intestino, (DUBEY et al., 1999). Essa forma de transmissão, através da via fecal-oral, pelos oocistos eliminados nas fezes de cão, foi confirmada experimentalmente (MCALLISTER, et al., 1998; De MAREZ et al., 1999; DIJKSTRA et al., 2001). Segundo Dijkstra et al., 2002, a presença de fezes de cães nos bebedouros e em cochos de alimentação aumenta de forma significativa a probabilidade de infecção do rebanho bovino por *N. caninum*.

A transmissão vertical ocorre durante o nascimento, pela via transplacentária sendo esta, a forma mais comum de contaminação (SCHARES et al., 1998). Esta via de transmissão também tem sido considerada a principal forma de disseminação de *N. caninum* em rebanhos bovinos, por manter a infecção por várias gerações, mantendo o parasito nas populações animais já infectados (BJORKMAN, JOHASSON e STENLUND, 1996; TREES; WILLIAMS, 2005). Esse tipo de transmissão, pode ocorrer de duas formas, uma delas, é quando a fêmea prenhe entra em contato com o parasito através da via oral, com a disseminação do parasito na fase aguda da infecção, ocorre a passagem de taquizoítos pela interface materno-fetal. Outra forma é através da reativação de uma infecção latente, que ocorre devido a mudança do perfil de resposta imunológica do padrão Th1 para o padrão Th2, essa mudança ocorre por causa da variação hormonal da fêmea prenhe, e é importante para a aceitação do conceito pelo organismo materno (INNES et al., 2001; QUINN et al., 2002).

De acordo com Souza, 2001, o cão representa a única fonte de infecção no processo de disseminação da forma sexuada de *N. caninum*, desempenhando um papel importante na cadeia natural do parasito.

O *N. caninum*, infecta tanto animais domésticos quanto animais silvestres, além dos cães, anticorpos específicos contra *N. caninum* foram identificados em gatos, bovinos, equinos, ovinos, caprinos, búfalos, camelídeos, cervídeos, raposas, lobos, cachorros do mato, gambás, capivaras, guaxinins e mamíferos marinhos (DUBEY et al., 1999; GENNARI, 2004; VITALIANO et al., 2004). Os hospedeiros definitivos são carnívoros, até o momento foram identificadas as seguintes espécies: o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo (cão silvestre australiano – *Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo

cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). Entre os hospedeiros intermediários, os principais são o cão e o bovino, além destes existem relatos de infecção em ovinos, caprinos, lagomorfos (ALMERÍA et al., 2007), bubalinos, equinos, camelídeos (WOLF et al., 2005; SADREBAZZAZ et al., 2006), várias espécies de cervos (TIEMANN et al., 2005; DUBEY et al., 2009), antílope, bisão (CABAJ et al., 2005; DUBEY & THULLIEZ, 2005), guaxinim, marsupiais (YAI et al., 2003), raposa vermelha (JAKUBEK et al., 2001; ALMERÍA et al., 2002; HAMILTON et al., 2005; JAKUBEK et al., 2007; MURPHY et al., 2007; MARCO et al., 2008), raposa cinzenta (LINDSAY et al., 2001), lobo (BJÖRKMAN et al., 2010), felinos selvagens (SOBRINO et al., 2008; ANDRÉ et al., 2010), rinoceronte (SANGSTER et al., 2010), pequenos roedores (JENKINS et al., 2007; FUEHRER et al., 2010), capivara (TRUPPEL et al., 2010), javali (BÁRTOVÁ et al., 2006), mamíferos marinhos (DUBEY et al., 2003) e aves como urubus e corvos (DARWICH et al., 2011).

2.2. Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) é formado por uma intrincada rede de neurônios e células gliais. (Figura 3). Majoritariamente por células gliais e em menor porcentagem por neurônios. (JAMES; BUTT, 2002). As células gliais representam mais de 90% do cérebro humano, e 10% da população dessas células, num adulto normal é formada por micróglia. A micróglia e macroglia possuem, origem, função, morfologia e perfil de expressão gênica, distintas. Estas células podem suportar e proteger as células neuronais e são distribuídas por todo o cérebro e parênquima da medula espinal, apesar de haverem distinções entre sua densidade em diferentes regiões do SNC (GRETER; MERAD, 2013). Os neurônios se diferenciam das células gliais devido a sua polaridade, que permite que essas células realizem processos especializados. Certas especializações dos neurônios tais como: membrana celular específica para o transporte de sinais nervosos e impulsos eletroquímicos; dendritos, que recebem e liberam os sinais; o axônio, que é o condutor de sinais, e contatos sinápticos, onde a informação pode ser passada de uma célula para outra, permite aos

neurônios receber conexões específicas e transmiti-las a outros neurônios. (MOREST; SILVER 2003).

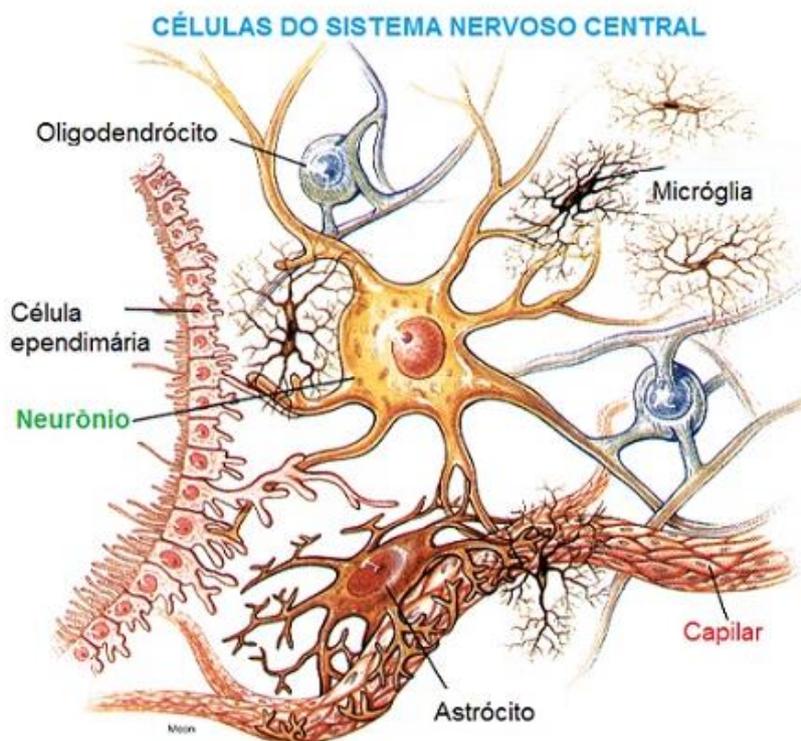


Figura 3. Células do SNC: Oligodendrócito, microglia, astrócito, neurônio e célula ependimária. <http://www.medicinageriatrica.com.br/>

As células gliais podem ser divididas em duas classes: a macroglia composta por astrócitos e oligodendrócitos e a microglia, as menores células gliais conhecidas (JAMES; BUTT, 2002). As células da microglia são um tipo especializado de macrófagos do SNC cuja função é fagocitar detritos e restos celulares presentes no tecido nervoso, sendo estas, células imuno-efetoras do SNC. Essas células também possuem uma função imunoprotetora, quando expostas a estímulos capazes de gerar inflamação (HAYDON, 2001; MOREST; SILVER 2003; HE; SUN, 2007). Além de ser o primeiro tipo celular que responde a danos no SNC, tais como patógenos que se infiltram, também participam da

regulação da função sinapse e neurogênese, a produção de fatores tróficos e depuração de células apoptóticas (CRONK; KIPNIS 2013).

Os astrócitos, compõem aproximadamente metade da população das células do cérebro, são essenciais na manutenção da homeostase cerebral, interagem com as outras células do sistema nervoso central promovendo o suporte metabólico, físico e estrutural dos neurônios (RIDET et al. 1997; SONG et al. 2002; TAKANO et al. 2009). Os oligodendrócitos formam a bainha de mielina, que protegem os neurônios. (MOREST; SILVER 2003).

A imunidade inata no sistema nervoso central é dependente inicialmente dos astrócitos e da micróglia, pois estas células são capazes de reconhecer e responder de forma rápida às infecções, sendo elas as responsáveis pelo recrutamento e ativação de células do sistema imune essenciais para a eliminação do patógeno (GIULIAN, 1994; FISCHER, 2001). As células da glia, astrócitos e micróglia podem, por si mesmas, iniciar, regular e sustentar a resposta inflamatória no SNC (BERCHER et al., 2000). Segundo Benveniste, 1992, quando as células do sistema imune entram no tecido nervoso, essas células promovem modificações na resposta glial, especialmente, dos astrócitos e da microglia, fazendo com que essas células adquiram novas competências imunológicas, como a secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, além da intervenção nos processos de apresentação de antígenos.

Levando em consideração que existem semelhanças nos processos fisiológicos e patológicos que modulam a resposta imune no tecido nervoso e em outros tecidos, o SNC tem sido considerado um local imunologicamente especializado, onde a interação entre células nervosas e células imunocompetentes ainda necessita ser melhor compreendida. As interações que ocorrem entre as células endoteliais, astrócitos e micróglia compõem um sistema complexo dentro do SNC, que regulam a permeabilidade da barreira hematoencefálica (HUDSON et al., 2005; PEDEMONTE et al., 2006). A ativação da micróglia pode estar associada à produção de mediadores anti-inflamatórios (PERRY et al., 2004). Assim como outros macrófagos, a micróglia participa nos processos de reparo após infecção ou injúria, restaurando dessa forma, a homeostasia normal do tecido (COLTON et al., 2009).

2.2.1. Astrócitos

Os astrócitos são os mais abundantes e os maiores representantes das células gliais. Como o próprio nome sugere, são células que têm a forma de estrela e são distribuídos por todo o cérebro e medula espinal. Dependendo da sua localização anatômica, diversos fenótipos e funções podem ser descritos, estando diretamente relacionado com o desenvolvimento, homeostasia e detoxificação do SNC. Desta forma os astrócitos são divididos em dois grupos principais, os astrócitos protoplasmáticos e os fibrosos (Figura 4), (TARDY et al., 1991; MONTGOMERY, 1994; KANDEL, 2000). Astrócitos protoplasmáticos são encontrados na massa cinzenta e exibem muitos processos de ramificação. Já os astrócitos fibrosos são mais comuns na matéria branca apresentando muitos processos longos (GEE; KELLER, 2005).

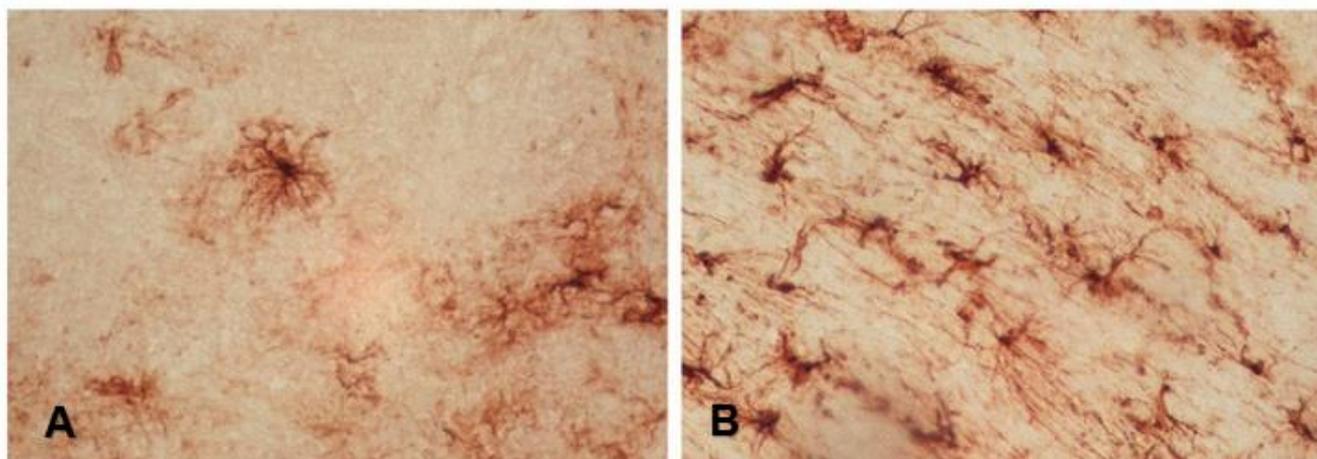


Figura 4. Fotomicrografias de imuno-histoquímica de cérebro de rato marcadas com anticorpo anti-GFAP, proteína ácida fibrilar glial (GFAP). A – astrócito protoplasmático, B – astrócito fibroso. <http://www.wesapiens.org/>

Os astrócitos protoplasmática, funcionalmente, estão associados com corpos de células neuronais e sinapses, os astrócitos fibrosos, por sua vez estão associados com axônios (ALLEN; BARRES 2009, CHABOUB; DENEEN 2012). Estas células gliais são derivadas da neuro-ectoderme durante o desenvolvimento embrionário e são essenciais para a homeostase cerebral (FARINA, et al., 2007).

Essas células, ainda contribuem de forma ativa para o suporte energético e para a resposta imune do SNC contra agentes químicos, infecciosos ou

traumatismos (LETOURNEL-BOULLAND et al., 1994; BARRES; BARDES, 2000). Uma das funções mais importantes dos astrócitos são o controle da homeostasia cerebral e proteção dos neurônios contra agentes externos dentro do SNC. Essas células apresentam essa capacidade devido a uma variedade de sistemas enzimáticos, produção de fatores tróficos e de agentes pró-oxidantes. Sua localização estratégica em estreita associação com outras células gliais, os neurônios e vasos sanguíneos lhes permite responder de forma eficiente às mudanças no ambiente do SNC. Os astrócitos ainda respondem a diversos tipos de lesões no SNC, como infecção, trauma e isquemia. Estas células possuem as características de responder a vários tipos de danos neurológicos, por meio de um sistema de ativação, denominado de astrogliose. Nesse estágio ativado, os astrócitos liberam diversos mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (EDDLESTON; MUCKE, 1993; RIDET, 1997; PRIVAT et al., SOFRONIEW 2009).

Esse estágio de ativação dos astrócitos, a astrogliose, está associado com a alteração do fenótipo celular devido à regulação positiva da expressão de um grande número de moléculas, principalmente de filamentos intermediários contendo a proteína ácida do gliofilamento (GFAP). O aumento na expressão dessa proteína indica que ela funciona como um marcador de reatividade astrocitária. (SILVA et al. 2008). Os astrócitos produzem e liberam mediadores imunes como Interferon Gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e IL-6, que podem levar à ativação pró-inflamatória da microglia. Enquanto, a liberação de TGF- β e IL-10 podem ser deslocados para a ativação anti-inflamatória da microglia (HANISCH, 2002; LU et al., 2010, NORDEN; FENN et al., 2014).

Pinheiro et al., 2006, observaram em culturas de astrócitos infectadas por *N. caninum*, um aumento na produção de NO e elevação dos níveis de TNF- α , também houve liberação de Interleucina 10 (IL-10), além de apresentarem aumento da atividade da lactato desidrogenase, evidenciando a resposta dessas células frente à infecção. Em outro estudo, desta vez com culturas mistas, astrócitos e microglia infectadas com *N. caninum* foi observado que houve diminuição do número de taquizoítos, sugerindo que a produção de TNF- α , IL-6 e

NO, foram os principais fatores para a promoção desse controle. (Pinheiro et al, 2010).

2.3. Resposta Imune

A resposta imunológica do hospedeiro à infecção por *N. caninum* é mediada pela resposta celular e humoral. Uma vez que *N. caninum* é um parasito obrigatoriamente intracelular a resposta imune mediada por células é fundamental para a proteção do hospedeiro, (OLIVEIRA, 2004). De acordo com Hemphill et al., (2006), a resposta imune inata do hospedeiro ao *N. caninum* parece ser mediada por células *natural killers* (NK).

Na resposta adquirida que é predominantemente, do tipo inflamatória, ocorre a produção de citocinas do tipo Interleucina 12 (IL-12) e IFN- γ e a participação das células T CD4⁺ (KHAN et al., 1997). Em seus trabalhos, Khan et al., (1997) e Nishikawa et al., (2001), observaram que a ausência de IFN- γ em ratos tornou esses animais mais susceptíveis à neosporose, sendo dessa forma tanto o IFN- γ quanto a IL-12, importantes citocinas na proteção natural contra a infecção causada por *N. caninum* (SHER et al., 2003).

A importância do IFN- γ durante infecção por *N. caninum* já havia sido demonstrada em trabalhos onde foi observada elevada susceptibilidade a infecção por *N. caninum* em camundongos *knockout* para IFN- γ e também em camundongos que tinham recebido tratamento com anticorpos anti IFN- γ (DUBEY; LINDSAY, 1996; KHAN et al., 1997). Seguindo o mesmo raciocínio, culturas de células glias, infectadas com *N. caninum* e que foram tratadas com citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ ou TNF- α) apresentaram um controle da proliferação dos taquizoítos, (JESUS, 2011). Em um trabalho mais recente onde analisou-se co-culturas de neurônios e células glias infectadas com *N. caninum*, observou-se que o tratamento com IFN- γ , reduziu o número de parasitos 72 horas após a infecção (JESUS et al, 2014). Pinheiro et al. 2006b, observaram altos níveis de Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 6 (IL-6) em estudos realizados utilizando-se culturas primárias de células glias de ratos infectadas com o *N.*

caninum, indicando o possível efeito regulador dessas citocinas, na proteção do sistema nervoso.

No estágio inicial da imunidade adquirida, o IFN- γ , produzido pelas células T, ativa macrófagos e dessa forma promove a destruição dos parasitos intracelulares (TANAKA et al., 2000), a IL-12 que é produzida pelas células fagocíticas infectadas, estimula a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ em células produtoras de citocinas pró-inflamatórias, estimulando as células NK a produzirem IFN- γ . Essas mesmas células, também ativam macrófagos e eliminam células infectadas pelo parasito, por meio de mecanismos mediados por óxido nítrico (NO) (STASKA et al., 2003; BOYSEN et al., 2006; WILLIAMS e TREES, 2006).

Segundo Andrianarivo et al., (2001), em relação à resposta celular, infecções experimentais com *N. caninum* induziram uma resposta imunológica típica T helper 1 (Th1), caracterizada por níveis elevados de IFN- γ e IL-12, tanto em animais infectados naturalmente quanto em animais infectados experimentalmente. Alguns estudos mostram que a resistência aos protozoários intracelulares, como *N. caninum*, depende de respostas imunes mediadas por citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos T CD4⁺, com a imunidade mediada por células desempenhando um importante papel para o controle da infecção (HEMPHILL, 1999; HUNTER; REINER, 2000).

Em estágios tardios da infecção a resposta humoral é mediada por anticorpos específicos que destroem os taquizoítos, dificultando a sua penetração nas células teciduais e ainda por mecanismo como citotoxicidade celular dependente de antígeno e opsonização (MARKS et al., 1998). As células TCD4⁺ são fundamentais para a produção desses anticorpos anti-*N. caninum*, induzindo outros mecanismos de proteção (TANAKA et al., 2000).

Entretanto, respostas imunes do tipo Th1, são incompatíveis com o sucesso de uma gestação, (RAGHUPATHY, 1997). As implicações da infecção em uma fêmea gestante podem ser a reabsorção do embrião, o abortamento do feto ou o nascimento de bezerros infectados congenitamente, podendo transmitir a infecção à sua descendência. (BUXTON; McALLISTER.; DUBEY, 2002). Por isso que quando a infecção acontece durante a gestação ocorre uma imunomodulação da resposta que leva à expressão de citocinas para um padrão

Th2, este perfil é induzido sobretudo pelos níveis elevados de progesterona que são mantidos durante a gestação. Desta forma tanto o feto quanto seus anexos podem ser reconhecidos como 'próprios' durante o período gestacional, (INNES et al., 2002). Durante esses eventos, o sistema imunológico da fêmea é levado a optar entre a resposta imunológica ao *N. caninum*, o que levaria ao comprometimento da gestação ou ao empenho na manutenção da gestação e a consequente reativação do parasito (QUINN et al., 2002).

A imunomodulação, durante a gestação é mediada por IL-10, que possui efeitos inibitórios sobre a atividade microbida de macrófagos ativados por IFN- γ , diferenciação de clones Th1, produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, além da produção de IL-12 por células acessórias, sendo altamente expressa em astrócitos advindos de cultivo primário infectados por *N. caninum* (INNES et al., 2002; PINHEIRO et al., 2006).

2.4. Própolis

2.4.1. Caracterização e histórico da própolis

A própolis é um material resinoso formado por uma mistura de exsudatos de plantas enriquecido com produto de saliva de abelhas e cera. É uma mistura complexa de substâncias que as abelhas coletam de várias plantas, modificam e depositam em seus ninhos, com a finalidade de proteger a colmeia contra microorganismos, predadores e de correntes de ar e luz solar (PEREIRA; et al., 2003; DRAGO et al., 2007; BÚFALO et al., 2009). O nome própolis é derivado do grego e significa em defesa da cidade neste caso, em defesa da colmeia, (MARCUCCI, 1995, 1996), já que é utilizada pelas abelhas como esse objetivo.

A flora disponível na localidade influencia diretamente no tipo, coloração e na quantidade da própolis produzida pelas abelhas. Existem ainda outros fatores que estão relacionados com a produção e qualidade da própolis como, localização do apiário, materiais utilizados, densidade da colmeia e época do ano (COSTA; OLIVEIRA, 2005). Como a coloração da própolis varia de acordo com a matéria prima utilizada, ela é encontrada nas cores amarela, parda, verde limão,

vermelho escuro, cinza esverdeado e café. (COUTO; COUTO 2002). Desta forma, pode-se dizer que as propriedades biológicas da própolis estão ligadas diretamente com a sua composição química, sendo este provavelmente o maior problema para o seu uso em fitoterapia, já que sua composição química varia em decorrência de diversos fatores, (RAMOS, 1995).

A própolis é também um dos muitos produtos naturais utilizados pela humanidade durante séculos. O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 A.C. (DA SILVA et al., 2006). Seu emprego já era descrito pelos egípcios, gregos, assírios, incas e romanos. No Egito antigo (1200 A.C., *cera negra*) por conhecer as propriedades anti-putrefativas desse composto, a própolis era utilizada pelos egípcios como um dos materiais para embalsamar os mortos. Já os gregos adotaram como cicatrizante interno e externo. Foi reconhecida por suas propriedades medicinais por médicos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno (PEREIRA et al., 2002, CASTALDO e CAPASSO, 2002). Na França, o termo própolis já era descrito no século XVI e na Inglaterra, em Londres, a própolis é listada como droga oficial na Farmacopeia do século XVII (CAPASSO e CASTALDO, 2002; PEREIRA et al., 2002; CAO et al., 2004).

Ao final da guerra no século, XIX, na África do Sul, a própolis foi bastante utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e durante a segunda guerra mundial também foi utilizada em várias clínicas soviéticas, tanto que, na antiga União Soviética, a própolis era utilizada tanto em medicina humana quanto veterinária, sendo utilizada até mesmo no tratamento da tuberculose. Em meados dos anos 80, a própolis se tornou um importante produto na medicina alternativa e complementar. (IOIRISH, 1982; WOISKY et al, 1994; MARCUCCI, 1996; SALATINO et al., 2005).

Segundo Lima, 2006, o interesse pela própolis, no Brasil, surgiu na década de 80 quando, Ernesto Ulrich Breyer, em seu livro intitulado, *Abelhas e saúde*, demonstrou além das propriedades terapêuticas da própolis a utilização desta, como antibiótico natural. A partir daí diversos trabalhos foram desenvolvidos e publicados por vários autores, a respeito da própolis e desde então a própolis brasileira tem sido alvo de grande interesse internacional. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de própolis e a qualidade da própolis brasileira é considerada uma das melhores do mundo (NETO et al., 2002; LIMA, 2006). O

Japão que tem grande interesse nas propriedades da própolis, tendo preferência pela própolis brasileira, é o nosso principal importador (SALATINO et al., 2005).

2.4.2. Utilização e propriedades terapêuticas da própolis

Atualmente, a própolis é empregada na fabricação de produtos farmacêuticos e cosméticos, além de ser introduzida na alimentação juntamente com outros produtos apícolas como a geleia real e o mel (VIUDA-MARTOS et al., 2008). A própolis é produzida pelas abelhas a partir de material coletado em gemas, botões e córtex vegetais, e seu complexo conjunto de substâncias é constituído basicamente por resinas, cera, óleos vegetais e pólen, apresentando uma variedade de compostos fenólicos, sobretudo flavonóides, além destes encontra-se também ácidos aromáticos, aminoácidos, polissacarídeos, ésteres, aldeídos, terpenos, hidrocarbonetos, álcoois, hidroxibenzenos e outros (MARCUCCI, 1995; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

Análises químicas mais detalhadas indicam que a própolis possui mais de 300 substâncias diferentes em sua composição, (BANKOVA et al., 2000; CASTRO, 2001). Dentre os componentes da própolis, que possuem ação farmacológica, os mais importantes são os flavonóides, os fenóis e os ácidos aromáticos (UZEL; et al., 2005) em que se destacam o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (ArtepelinC) (MATSUNO; et al., 1997) e o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) (KUO; et al., 2006), descritos na literatura como agentes que inibem o crescimento de células cancerígenas. Silva et al, (2011) ao avaliarem o potencial citotóxico do extrato da própolis em células escamosas de carcinoma oral, concluíram que o extrato de própolis inibiu a proliferação e viabilidade das células SCC-158. Sugerindo uma possível alternativa de tratamento para tumores, sendo necessário a realização de mais estudos para determinar estes efeitos e os mecanismos de ação. Apesar da atividade farmacológica da própolis ser comumente atribuída aos compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos (BURIOL et al., 2009), suas distintas atividades farmacológicas podem também decorrer do sinergismo entre seus diversos compostos químicos (MENEZES, 2005).

A própolis tem um papel terapêutico muito importante já comprovado, exercendo ação, anti-inflamatória, antiúlcera, antibacteriana e anticâncer (MARCUCCI, 1996). Esta substância também apresenta efeito imunoregulador mediante a produção de fatores envolvidos no processo inflamatório, como citocinas, prostaglandina e quimiocinas. Foi observado que extratos etanólicos e aquosos da própolis diminuíram a extensão da resposta inflamatória por meio da inibição da produção de prostaglandina, além de um provável impedimento da ativação de macrófagos (HU et al., 2005). Essa ação antiinflamatória da própolis é atribuída à presença de ácido cafeico, quercetina, nargenina e do éster fenílico do ácido cafeico, responsáveis pela supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos. A inibição na geração de óxido nítrico por macrófagos também é apontada como um dos fatores responsáveis pela atividade anti-inflamatória da própolis (MIRZOEVA; CALDER, 1996; MENEZES, 2005). Outra forma pela qual a própolis pode conter a inflamação seria através da diminuição da produção de citocinas pró inflamatórias, (SY et al., 2006). A própolis tem demonstrado ação antiinflamatória também por ativar a glândula timo, auxiliando o sistema imune pela promoção da atividade fagocítica e estimulando a imunidade celular (KOSALEC et al., 2005). Estudos sobre a atividade imunomodulatória da própolis indicaram um incremento no número de linfócitos CD4 e CD8 em camundongos tratados com éster fenólico do ácido caféico (CAPE), composto fenólico presente na própolis, bem como o estímulo na produção de anticorpos específicos (PARK et al., 2004; SFORCIN et al., 2005).

Este amplo espectro de atividades biológicas se deve à variabilidade de seus componentes químicos, dependentes da espécie vegetal da qual o material é coletado, bem como da época do ano e da localização geográfica (SCHNITZLER et al., 2010b).

A atividade antimicrobiana da própolis coletada em diferentes localizações geográficas no Brasil já foi descrita por pesquisadores brasileiros (SFORCIN et al., 2000; SANTOS et al., 2002; SANTOS et al., 2005;) e estrangeiros; (KUJUMGIEV et al., 1999; BANSKOTA et al., 2001). Em um estudo realizado afim de observar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcóolico de própolis, Vargas et al., (2004), observaram que o extrato alcóolico de própolis apresentou atividade antibacteriana *in vitro*, inibindo o crescimento de 67,70% das amostras

de *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Rhodococcus equi*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas. Esta atividade é relacionada à presença de flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina (BURDOCK, 1998). Buriol e colaboradores, (2009), afirmaram que a própolis apresenta atividade antibiótica independente de sua origem, devido aos efeitos bactericida e fungicida indispensáveis para preservar a vida na colmeia. Segundo alguns pesquisadores, a ação sinérgica dos componentes da própolis é bastante relevante, podendo se constituir como alternativa terapêutica para a resistência microbiana, no entanto dependente de sua composição (STEPANOVIC et al., 2003; FERNANDES et al., 2005; ONLEN et al., 2007).

Além da atividade antibacteriana, a própolis se destaca por sua ação antifúngica. Segundo Uzel et al., (2005), a própolis brasileira possui ação frente a diferentes espécies de *Candida*. Além das ações antifúngica, a própolis apresenta ação fungistática e fungicida, comprovadas em testes *in vitro*, frente a leveduras causadoras de onicomicoses (LONGHINI et al., 2007; BITTENCOURT, 2008).

No que se refere a atividade antiviral da própolis esta já foi avaliada frente a alguns vírus patogênicos ao homem e a animais, como o herpes vírus humano tipo 1 (HSV1) (AMOROS et al., 1992; HULEIHEL; ISANU, 2002) e tipo 2 (HSV2) (VYNOGRAD et al., 2000; SCHINTZLER et al., 2010a), vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GEKKER et al., 2005), e vírus da influenza aviária (KUJUMGIEV et al., 1999) demonstrando resultados promissores.

Extratos etanólicos de própolis provenientes de várias regiões geográficas inibiram a expressão do vírus HIV em células da micróglia e linfócitos T CD4+, a partir de ensaios que quantificam a fusão do HIV à membrana celular, foi demonstrado que o mecanismo antiviral da própolis envolveu a inibição da entrada viral nas células (GEKKER et al., 2005).

Cueto e colaboradores, (2011) avaliaram a atividade antiviral de dois extratos etanólicos de própolis frente aos vírus, calicivírus felino, adenovírus canino tipo 2 e vírus da diarréia viral bovina e demonstraram que os extratos apresentaram atividade antiviral frente aos três diferentes vírus, evidenciando seu potencial para o desenvolvimento de novos compostos naturais com ação

antiviral, também realizaram análise dos extratos de própolis através da cromatografia líquida de alta eficiência que identificou a presença de flavonoides como: rutina, quercetina e ácido gálico.

Além das diversas propriedades já descritas e comprovadas, exercidas pela própolis, esta, ainda possui atividade antiprotozoárias (PONTIN et al., 2008). Testes realizados *in vitro* demonstraram a eficácia da própolis brasileira verde, coletada dos estados do Paraná e Minas Gerais, e da própolis vermelha, coletada do estado de Alagoas, como agentes antiprotozoários. Os efeitos da própolis, foram observados em culturas de macrófagos infectados pela *Leishmania amazonenses*, onde constatou-se uma redução da carga parasitária por intermédio do monitoramento da porcentagem de células infetadas e do número de parasitos intracelulares. A própolis vermelha, contendo elevada concentração de prenilados e benzofenonas, mostrou-se um extrato mais ativo que a própolis verde amostrada, uma vez que, inibiu a proliferação celular da forma amastigota e não apresentou toxicidade para as culturas de macrófagos, levando a uma redução de 84,5% do nível de infecção na concentração de 6 µg/mL. No entanto, o extrato não apresentou efeito direto nas formas promastigota e amastigota extracelulares, sugerindo que os constituintes da amostra de própolis vermelha intensificam o mecanismo de ativação dos macrófagos levando à morte de *L. amazonenses* (AYRES et al., 2007). A própolis tem mostrado efeito protetor contra as várias espécies de *Leishmania* estudadas, seja por atuar diretamente sobre as formas promastigotas e/ou amastigotas, por agir na produção de substâncias microbicidas pelos macrófagos ou ainda por diminuir o diâmetro das lesões em experimentos *in vivo*. (ODA et al., 2011).

Em estudos realizados utilizando extrato etanólico de própolis, administrado por via oral em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*, na dose de 50mg do extrato/kg, demonstraram uma diminuição da parasitemia, e da massa do baço. Além disso, uma análise do perfil dos leucócitos no sangue periférico, com base na quantificação das populações das células T, demonstrou uma expansão das células CD8. A constituição do extrato etanólico utilizado constatou a presença de 42% de flavonoides e 12% de ácidos fenólicos, (DANTAS et al., 2006a). Em outros estudos realizados utilizando extratos etanólicos com própolis colecionadas de diferentes regiões do Brasil com o

objetivo de verificar efeitos antimicrobianos e a atividade contra *T. cruzi*, associando a composição química das amostras analisadas, os resultados encontrados associam o efeito tripanossomicida à presença do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e do 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopiran, (SALOMÃO et al., 2008; SOEIRO et al., 2009).

Ademais a atividade antiprotozoário da própolis já foi demonstrada contra *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas* spp. e *Giardia lamblia*, além de *Trypanosoma cruzi* (PRYTZYK et al., 2003; DANTAS et al., 2006).

BIBLIOGRAFIA

- ADELMANN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2005, 186p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 2005.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M. G.; MACHADO, S. T. Z.; DE BORTOLLI, C. P.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; ALEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Captive Neotropical and Exotic Wild Canids and Felids. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 1007-1009, out. 2010. doi: 10.1645/GE-2502.1
- ADREOTTI R.; BARROS J. C.; PEREIRA A. R.; OSHIRO L. M.; CUNHA R. C.; FIGUEIREDO NETO L. F. 2010. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**. Vet. 19:119-123.
- ANDRIANARIVO, A.G.; BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; ROWE, J.D.; PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, n.87, p.817-825.2001.
- ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 107, n. 4, p. 287-294, ago. 2002. doi:10.1016/S0304-4017(02)00162-0
- ALMERÍA, S.; VIDAL, D.; FERRER, D.; PABÓN, M.; FERNÁNDEZ-DE-MERA, M. I. G.; RUIZ-FONS, F.; ALZAGA, V.; MARCO, I.; CALVETE, C.; LAVIN, S.; GORTAZAR, C.; LÓPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 143, n. 1, p. 21-28, jan. 2007. doi:10.1016/j.vetpar.2006.07.027
- ALVAREZ-MAUBECIN, V.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, F.; WILLIAMS, J. T.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Functional coupling between neurons and glia. **The Journal of Neuroscience**. v. 20, n. 11, p. 4091 - 4098, 2000.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 417-431, 2000.
- BANSKOTA, A. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. **J Nat Prod**, Downers Grove, v.61, n.7, p.896–900, 1998.
- BÁRTOVÁ, E.; SEDLÁK, K.; LITERÁK, I. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. **Veterinary**

Parasitology, Amsterdã, v. 142, n. 1-2, p. 150-153, nov. 2006.
doi:10.1016/j.vetpar.2006.06.022

BECHER, B., PRAT, A., ANTEL, J. Brain-Immune connection: immunoregulatory properties of CNS – resident cells. **Glia**, v. 29, p. 293-304, 2000.

BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271–4, 1984.

BJERKÅS, I.; PRESTHUS, J. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 445–54, 1988.

BJÖRKMAN, C.; JAKUBEK, E. –B.; ARNEMO, J. M.; MALMSTEN, J. Seroprevalence of *Neospora caninum* in gray wolves in Scandinavia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 173, n. 1-2, p. 139-142, out. 2010.
doi:10.1016/j.vetpar.2010.06.006

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

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M., dos SANTOS, J.M.T.; da ROSA, M.R.; QUINAIA, S.P.; et al. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. **Quimica Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

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

CABAJ, W.; MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; GILL, J. Antibodies to *Neospora caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Poland. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 128, n. 1-2, p. 163-168, mar. 2005. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.033

COLTON, C.A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. **J. Neuroimmune Pharmacol**, v. 4, p. 399-418, 2009.

COSTA, S L ; SILVA, A.R. ; PINHEIRO, A M ; SOUZA, C.S ; Freitas, S.R.V.B. ; FREIRE, S. M. ; VELOZO, E. ; TARDY, M. ; EL-BACHA, R S ; COSTA, M. F. D. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF- α and NO release in primary glial cell cultures DOI: 10.1007/s10565-007-9017-y. **Cell Biology and Toxicology**, v. X, p. 13-19, 2007.

COSTA, T. L.; SILVA, M. G.; RODRIGUES, I. M. X.; BARBARESCO, A. A.; AVELINO, M. M.; CASTRO, A. M. Diagnóstico Clínico e Laboratorial da Toxoplasmose. **NewsLab**, v. 85, p. 88-104, 2007.

DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n.10, p. 1647-1657, 1999.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 89-98, 2002.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747-52, 2001.

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

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

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; LINDSAY, D. S.; JENKINS, M. C.; UGGLA, A.; SPEER, C. A. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 66-69, 2002b.

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

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; McALLISTER, M. M.; 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. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002a.

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

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Wild Animals. **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1217-1218, out. 2005. doi: 10.1645/GE-576R.1

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; KWOK, O. C. H.; ZINK, R. L.; MICHALSKI, M. L.; ULRICH, V.; GILL, J.; CARSTENSEN, M.; THULLIEZ, P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Iowa and Minnesota using four serologic tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 161, n. 3-4, p. 330-334, maio 2009. doi:10.1016/j.vetpar.2009.01.002

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—The last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, ago. 2011. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.031

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, 2011.

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

FARINA, C., ALOISI, F., MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in immunology**, v. 28, n. 3, p. 138-145, 2007.

FISCHER, H. G.; REICHMANN, G. Brain dendritic cells and macrophages / microglia in central nervous system inflammation. **J. Immunol.**, v. 166(4), p. 2717-26, 2001.

FUEHRER, H. P.; BLÖSCHL, I.; SIEHS, C.; HASSL, A. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). **Parasitology Research**, Berlim, v. 107, n. 2, p. 469-473, 2010. doi: 10.1007/s00436-010-1905-z

FRANCO, T. T.; KUREBAYASHI, A. K. Isolamento de princípios ativos da própolis por cromatografia em papel bidimensional e dosamento espectrofotométrico. **Revista Del Instituto Adolfo Lutz**. n.46 (1/2), p.81-86, 1996.

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

- GIULIAN, D.; LI, J.; LEARA, B.; KEENEN, C. Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. **Neurochem Int.**, v. 25(3), p. 227-33, 1994.
- GIRALDI, J.H., *et al.* Neosporose canina. **Clínica Veterinária**, n.34, p.50-56, 2001
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 72, n.3, p. 353-358, 2005.
- GRETER, M.; MERAD, M. 2013. Regulation of microglia development and homeostasis. **GLIA**, 61(1), 121-7.
- HAMILTON, C. M.; GRAY, R.; WRIGHT, S. E.; GANGADHARAN, B.; LAURENSEN, K.; INNES, E. A. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from around the UK. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 130, n. 1-2, p. 169-173, jun. 2005. doi:10.1016/j.vetpar.2005.03.020
- HEMPHILL, A. The host–parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, v. 43, p. 47–104, 1999.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 112, n. 2, p. 183-197, 1996.
- HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 133, p. 261-78, 2006.
- HUNTER, C. A.; REINER, S. L. Cytokines and T cells in host defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 4, p. 413-418, 2000.
- INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 497-504, 2002.
- INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 13, p. 1523-1534, 2001.
- JAKUBEK, E. B.; BRÖJER, C.; REGNERSEN, C.; UGGLA, A.; SCHARES, G.; BJÖRKMAN, C. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 102, n. 1- 2, p. 167-172, dez. 2001. doi:10.1016/S0304-4017(01)00513-1
- JAKUBEK, E. B.; FARKAS, R.; PÁLFI, V.; MATTSSON, J. G. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Hungarian red

foxes (*Vulpes vulpes*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 144, n. 1-2, p. 39-44, mar. 2007. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.011

JAMES, G.; BUTT, A. M. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signaling in glial cell pathology in the central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, 447, 247-260, 2002.

JESUS, E. E.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, A. B.; FREIRE, S. M.; TARDY, M. B.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, S. L.; COSTA, M. F. Effects of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 269-74, 2013.

KAMGA-WALADJO A. R.; GBATI O. B.; KONE P.; LAPO R. A.; CHATAGNON G.; BAKOU S. N. PANGUI L. J.; DIOP PEL H.; AKAKPO JÁ, TAINTURIER D. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. **Trop Anim Health Prod**. 2010:42:953-9.

KATAGIRI, S.; CAGNINI, F.; RIBEIRO, C. M.; LANGONI, H.; DA SILVA, A. V. Avaliação sorológica para *Neospora caninum* em propriedades de bovinos leiteiros com alterações reprodutivas. /Serological evaluation for neospora caninum in farms with dairy cattle showing reproductive alterations/evaluación serológica de Neospora cani. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 1, p. 124-130, 2013.

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

KUO, H.C.; KUO, W.H.; LEE, Y.J.; LIN, W.L.; CHOU, F.P.; TSENG, T.H. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v. 234, p. 199–208, 2006.

LANGONI, H.; DA SILVA, A. V.; KATAGIRI, S.; CAGNINI, F.; RIBEIRO, C. M. Infecção por *Neospora caninum* e suas implicações na performance reprodutiva de bovinos leiteiros. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 1, 2014.

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

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S.; WESTON, J. L.; LITTLE, S. E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon*

cinereoargenteus) from South Carolina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 97, n. 2, p. 159-164, maio 2001. doi:10.1016/S0304-4017(01)00390-9

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17(3): 388-395, Jul./Set. 2007.

MARCO, I.; FERROGLIO, E.; LÓPEZ-OLVERA, J. R.; MONTENÉ, J.; LAVÍN, S. High seroprevalence of *Neospora caninum* in the red fox (*Vulpes vulpes*) in the Pyrenees (NE Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 152, n. 3-4, p. 321-324, abr. 2008. doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.003

MARCUCCI MC. Própolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidol* 1995; 26(2): 83-99.

MARKS, J.; LUNDEN, A.; HARKINS, D.; INNES, E. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 1-7, 1998.

MATSUNO, T.; JUNG, S.K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Research**, v. 17, n. 5^a, p. 3565-3568, 1997.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MURPHY, T. M.; WALOCHNIK, J.; HASSL, A.; MORIARTY, J.; MOONEY, J.; TOOLAN, D.; SANCHEZ-MIGUEL, C.; O'LOUGHLIN, A.; MCAULIFFE, A. Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* and molecular evidence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infections in red foxes (*Vulpes vulpes*) in rural Ireland. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 146, n. 3-4, p. 227-234, maio 2007. doi:10.1016/j.vetpar.2007.02.017

NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, n. 4, p. 811-817, 2001.

OWENS, T.; BABCOCK, A. A.; MILLWARD, J. M.; TOFT-HANSEN, H. Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. **Brain Research Reviews**. v. 48, p. 178 -184, 2005.

ÖZAN F, SÜMER Z, POLAT ZA, Er K, ÖZAN Ü, DEGER O. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. **Eur J Dent.**; v.1, p.195-201, 2007.

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

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. A. Própolis produced in south Brazil, Argentina and Uruguay: Phytochemical evidence for the plant origin. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, vol.32, n. 06, Nov./Dec. 2002.

PEDEMONTE, E., MANCARDI, G., GIUNTI, D., C CORCIONE, A. BENVUTO, F., PISTOIA, V., UCCELLI, A. Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 555-566, 2006.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; ALMEIDA, M. A. O.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. D. Evaluation of IL-6, IL-10 and TNF- α in mixed glial cultures infected by *N. caninum*. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 442-7, 2010.

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.

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

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

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1993.

SADREBAZZAZ, A.; HADDADZADEH, H.; SHAYAN, P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in camels (*Camelus dromedarius*) in Mashhad, Iran. **Parasitology Research**, Berlim, v. 98, n. 6, p. 600-601, maio 2006. doi: 10.1007/s00436-005-0118-3

SARTOR, I. F., GARCIA FILHO, A., VIANNA, L. C., PITUCO, E. M., PAI, V. D., SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.4, p.413-418, 2005.

SANGSTER, C.; BRYANT, B.; CAMPBELL-WARD, M.; KING, J. S.; ŠLAPETA, J. Neosporosis in an Aborted Southern White Rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) Fetus. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 41, n. 4, p. 725-728, dez. 2010. doi: 10.1638/2009-0250.1

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

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

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

SILVA, B. N.; CISILOTTO, J.; MILÃO, D. 2011. Avaliação do potencial citotóxico do extrato de própolis da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (jataí). XII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, PUC, RS.

SOBRINO, R.; DUBEY, J. P.; PABÓN, M.; LINAREZ, N.; KWOK, O. C.; MILLÁN, J.; ARNAL, M. C.; LUCO, D. F.; LÓPEZ-GATIUS, F.; THULLIEZ, P.; GORTÁZAR, C.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 155, n. 3-4, p. 190-194, ago. 2008. doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.009

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

SPEER,, C.A.; DUBEY, J.P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. **Journal Parasitology**, v . 36, p. 457-463, 1989.

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

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

TIEMANN, J. C. H.; SOUZA, S. L. P.; RODRIGUES, A. A. R.; DUARTE, J. M. B.; GENNARI, S. M. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora*

caninum antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 134, n. 1-2, p. 73-76, nov. 2005. doi:10.1016/j.vetpar.2005.07.015

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

TRUPPEL, J. H.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R. R.; VILANI, R. G. D'O. C.; REIFUR, L.; BOERGER, W.; COSTA-RIBEIRO, C. V.; THOMAZ-SOCCOL, V. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitology International**, Amsterdã, v. 59, n. 3, p. 376-379, set. 2010. doi:10.1016/j.parint.2010.05.001

UZEL, A.; SORKUN, K.; ONCAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, M.; SALIH, B.; Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, n. 2, p. 189-195, 2005.

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

WOUDA, W.; MOEN, A.R.; VISSER, I.J.R.; VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 180-185, 1997.

WOLF, D.; SCHARES, G.; CARDENAS, O.; HUANCA, W.; CORDERO, A.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J.; GAULY, M.; ZAHNER, H.; BAUER, C. Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicuñas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 130, n. 1-2, p. 81- 87, jun. 2005. doi:10.1016/j.vetpar.2005.03.024

YAI, L. E.; CAÑON-FRANCO, W. A.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E.; CAMARGO, M. C.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 4, p. 870-871, ago. 2003. doi: 10.1645/GE-83R

CAPITULO 1

EFEITOS DA PRÓPOLIS EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS INFECTADAS COM *Neospora caninum*

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

EFEITOS DA PRÓPOLIS EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS INFECTADAS COM *Neospora caninum*

Resumo: A neosporose, uma patologia causada por *Neospora caninum*, provoca alterações reprodutivas em rebanhos bovinos e transtornos neuromusculares em cães. O parasito infecta e causa lesões em diversos tecidos do hospedeiro, apresentando um tropismo pelo Sistema Nervoso Central (SNC). Não existe nenhum tratamento para a neosporose, no entanto diversos trabalhos vêm sendo realizados utilizando-se a própolis, devido as suas ações farmacológicas, entre elas antiprotozoária. Deste modo, objetivou-se com esse trabalho, avaliar a ação modulatória da própolis em culturas de astrócitos de rato infectadas *in vitro* com *N. caninum*. Culturas primárias de astrócitos de ratos neonatos foram tratadas com 0,1% de própolis a partir do 16º dia após o cultivo e infectados com taquizoítos de *N. caninum*, da cepa NC-Bahia, no 20º dia de cultura. Após 60h de infecção foram realizados testes a fim de verificar o metabolismo mitocondrial, a atividade da lactato desidrogenase (LDH), produção de óxido nítrico e o número total de parasitos. Nas culturas tratadas com 0,1% de própolis observou-se uma redução significativa no de parasitos, além de aumento no metabolismo mitocondrial, na estabilidade das membranas e uma elevada produção de óxido nítrico nas culturas tratadas e infectadas. Sugerindo dessa forma, que a própolis pode exercer um papel antiprotozoário contra *N. caninum*.

Palavras-chave: Neosporose, SNC, Células gliais, Produto natural

EFFECTS OF PROPOLIS IN ASTROCYTE CULTURES INFECTED WITH *Neospora caninum*

Abstract: The neosporosis, a disease caused by *Neospora caninum* causes reproductive changes in cattle herds and neuromuscular disorders in dogs. The parasite infects and causes lesions in various tissues of the host, with a tropism for the central nervous system (CNS). There is no treatment for neosporosis, however several studies have been conducted using propolis because of its pharmacological actions, including antiprotozoa. Thus, the aim with this study was to evaluate the modulatory action of propolis in rat astrocytes *in vitro* cultures infected with *N. caninum*. Primary cultures of neonatal rat astrocytes were treated with 0.1% propolis from the 16th day after cultivation and infected with tachyzoites of *N. caninum* strain NC-Bahia, the 20th day of culture. After 60h of infection tests were conducted in order to ascertain mitochondrial metabolism, the activity of lactate dehydrogenase (LDH), nitric oxide production and the total number of parasites. In cultures treated with 0.1% propolis we observed a significant reduction in parasite, and an increase in mitochondrial metabolism in the stability of the membranes and a high production of nitric oxide in the treated and infected cultures. Suggesting thereby that propolis may play a role antiprotozoan against *N. caninum*.

Key words: Neosporosis, CNS, glial cells, natural product

1. INTRODUÇÃO

O protozoário, *Neospora caninum* é um parasito obrigatoriamente intracelular causador da neosporose, uma patologia, disseminada mundialmente e tem sido associada a casos de abortamento em bovinos, causando grandes perdas econômicas (DUBEY et al, 2007; KAMGA-WALADJO et al, 2010). Este parasito é capaz de infectar várias espécies animais, como canídeos, bovinos, equídeos e caprinos. Em cães, seus hospedeiros definitivos, o *N. caninum* causa distúrbios neurológicos e dermatológicos. Em bovinos, hospedeiros intermediários, provoca uma série de prejuízos econômicos, expressos principalmente como abortamento e queda na produção de leite (ADREOTTI 2010; VARASCHIN et al. 2012; MESQUITA et al. 2013). Em um estudo que avaliava a frequência de bovinos leiteiros soropositivos para *N. caninum* e a associação com alterações reprodutivas, Langoni e colaboradores (2013) observaram que, 61% dos animais positivos para *N. caninum*, apresentavam problemas reprodutivos, como retorno ao cio e abortamentos. Causando grande impacto econômico sobre a criação.

Por efeito da resposta imunológica do hospedeiro à infecção, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, com multiplicação lenta, agrupando-se em cistos teciduais, principalmente no sistema nervoso, como mecanismo de escape e manutenção no organismo infectado. (DUBEY et al., 2007). A imunidade inata no sistema nervoso central é dependente inicialmente dos astrócitos e da micróglia, pois estas células são capazes de reconhecer e responder de forma rápida às infecções, sendo elas as responsáveis pelo recrutamento e ativação de células do sistema imune essenciais para a eliminação do patógeno (GIULIAN, 1994; FISCHER, 2001).

Ainda não existe nenhum tratamento para a neosporose, no entanto nos últimos anos vem crescendo o interesse dos cientistas por produtos naturais, afim de identificar suas propriedades farmacológicas. Neste sentido, a própolis, um produto resinoso produzido pelas abelhas a partir de diversas fontes vegetais, vem sendo amplamente empregada na medicina popular e atrai atenção por suas utilidades na prática médica e cosmética devido às suas propriedades antifúngicas (DOTA et al., 2010), antibacterianas (ALVARES et. al., 2014),

antivirais (CUETO et al., 2011) e antiprotozoárias (ODA et al., 2011). Entretanto ainda não existe na literatura dados, sobre a atividade da própolis contra o protozoário *Neospora caninum*. Deste modo objetivou-se com este estudo, avaliar a ação modulatória da própolis em culturas de astrócitos de rato infectadas *in vitro* com *Neospora caninum*.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultura de astrócitos

As culturas de astrócitos foram obtidas de córtex cerebral de ratos Wistar neonatos (*Rattus norvegicus*) com menos de 48h de vida). Resumidamente, os animais foram eutanasiados, de acordo com protocolo previamente aprovado pela CEUA. Os hemisférios cerebrais foram retirados e a meninge foi removida, posteriormente os hemisférios cerebrais foram dissecados e as células foram submetidas à dissociação mecânica. Em seguida foi contado em hemacitômetro e distribuído em placas de 24 poços (TPP, Switzerland), contendo 2×10^5 células por poço.

As culturas de astrócitos foram mantidas em meio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (Ham)) (Gibco, EUA), suplementado com glutamina (2 mM) (Acrós Organics, EUA), bicarbonato de sódio (3 mM) (Reagen, Brasil), penicilina/estreptomicina (0,5 mg/ml) (Gibco, EUA), 5ml/L Anfotericina B e 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, EUA). As culturas foram então incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, com trocas regulares de meio a cada 48 horas (COSTA et al., 2002). Após 16 dias de cultura, quando havia confluência celular, o meio foi suplementado com 0,1% de própolis.

2.2. Obtenção da Propolis

A própolis foi obtida do Núcleo de Estudo dos Insetos – INSECTA da Universidade Federal da Bahia – UFRB. A coleta da própolis foi realizada semanalmente, por meio de dispositivos colocados nas caixas, chamados de coletor de própolis inteligente, utilizando-se régua coletora de própolis. As amostras coletadas foram pesadas, etiquetados e armazenados em freezer. Foram identificadas por dia/ mês/ ano e apiário. A própolis foi aquecida a fim de

auxiliar no processo de diluição, após isso o conteúdo foi peneirado e filtrado com filtro 0,22 μ m, posteriormente adicionado ao meio Dmem-F12, sendo utilizado a partir do 16^o dia de cultivo quando havia a formação de uma monocamada celular, na concentração de 0,1% por 96 horas.

2.3. Cultura de *N. Caninum*

Taquizoítos da cepa NC-Bahia (GONDIM et al., 2001) foram mantidos em culturas de células Vero, com mudanças regulares de meio RPMI 1640, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 5 mg/L de gentamicina a cada 48 horas.

2.4. Infecção das culturas de astrócitos

As células foram infectadas como descrito por Pinheiro et al. (2006) no 20^o dia de cultivo. Os parasitos foram purificados utilizando filtro de 5 μ m (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) e contados em hemacitômetro. Foi utilizada uma relação célula/parasito de 1:1, para infecção das culturas. O período de contato com o *N. caninum* nas células foi de 60h e após esse período os parasitos foram contados em câmara de Neubauer.

2.5. Efeitos tóxicos induzidos pela infecção

A integridade da membrana celular foi verificada pela dosagem de lactato desidrogenase (LDH). A LDH é um marcador biológico enzimático estável, e sua concentração se correlaciona linearmente com a estabilidade de membrana (PINHEIRO et al., 2006). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 60h após a infecção. A atividade da LDH foi determinada utilizando-se kits comerciais (Doles, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos em quadruplicata de 2 diferentes culturas e expressos em porcentagem de LDH.

A função mitocondrial foi determinada 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). Essa técnica baseia-se na redução do sal tetrazolato em consequência da atividade de desidrogenases mitocondriais resultando em uma reação de cor púrpura. Para o método de conversão do MTT em formazan foram adicionados 1,0 mg/mL de MTT (Amresco®, Solon, Ohio) às culturas, 2 horas antes do término do período de infecção. O meio foi removido e a concentração dos cristais de formazan foram dissolvidos em dimethyl sulfóxido

(DMSO), 5 minutos após a adição do DMSO as culturas foram quantificadas a 580nm utilizando um espectrofotometro (FEMTO 700 plus). Os resultados foram obtidos em quadruplicata de um experimento e expressos em porcentagem de MTT metabolizado.

2.6. Dosagem de Proteína

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

2.7. Dosagem de óxido nítrico

A quantidade de nitrito (NO_2) formado no sobrenadante das culturas foi usado como um marcador para a produção de óxido nítrico (NO) de acordo com o método de Griess (Won et al., 2004). Foram utilizadas alicotas de 50 μL , do sobrenadante das culturas que foram adicionados com igual volume 1:1 (v / v) em uma mistura de 1% sulfanilamida, 5% de ácido fosfórico e 0,1% N-etilenodiamina (1-naftil). A leitura foi realizada em uma absorbância de 490 nm usando um leitor de microplacas Universal Elx 800 (Biotek, Inc, EUA). As curvas padrões foram geradas em diluições seriadas do nitrito de sódio em meio de cultura. Os resultados foram obtidos em quadruplicata de 2 diferentes.

2.8. Imunocitoquímica

As alterações morfológicas foram avaliadas pela imunomarcção da proteína ácida do gliofilamento (GFAP), o principal componente do glicofilamento e um marcador específico dos astrócitos. As culturas foram fixadas em metanol a -20°C por 20 minutos e bloqueados com BSA 5% por 1 hora. Em seguida foram marcados com anticorpo IgG anti-GFAP (DAKO, Dinamarca) diluído em 1:500 em PBS overnight em câmara úmida a 4°C . Depois foram incubadas com anticorpo anti-IgG conjugado com tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC), (Cappel, Durham, Canadá) diluído a 1:500 por 1 hora em câmara escura em temperatura ambiente.

Posteriormente, as culturas foram analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Japão), usando uma câmara digital (Media Cybernetics, EUA) em objetiva de 20X.

2.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média \pm desvio padrão (SD). As comparações entre os grupos foram feitas com análise de variância, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Seguido pelo teste de Tukey

2.10. Declaração de Ética

Todos os protocolos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, protocolo 23007.010360/201469

3. RESULTADOS

3.1. Efeito induzido pela infecção

A dosagem da LDH, foi utilizada para determinar a integridade da membrana celular, analisando-se o aumento de permeabilidade da membrana dos astrócitos expostos aos tratamentos. Observou-se que nas culturas infectadas com *N. caninum* e tratadas com 0,1% de própolis houve um aumento de 100% na produção de LDH em relação ao controle. Nas culturas que foram apenas infectadas com *N. caninum* este aumento foi de 50% comparando-se com as culturas controle. Já nas culturas que foram tratadas com 0, 1% de própolis não houve diferença significativa em comparação com o controle. (Figura 1).

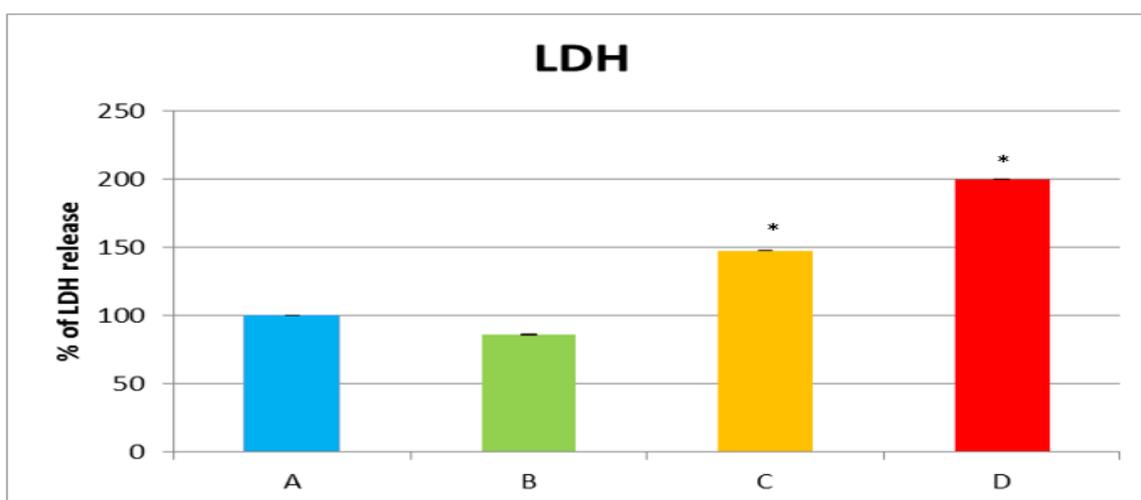


Figura 1 - Atividade da lactato desidrogenase no sobrenadante das culturas de astrócitos. A: controle; B: tratadas com 0,1% de própolis; C: culturas infectadas com *N. caninum* e D: tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum*. * $p < 0,05$.

Para avaliar o metabolismo mitocondrial das células, utilizou-se o método de conversão do MTT. As culturas que foram tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum*, apresentaram uma redução na atividade mitocondrial em relação ao controle, enquanto que aquelas tratadas com própolis tiveram aumento de aproximadamente 20% em relação ao controle. (Figura 2)

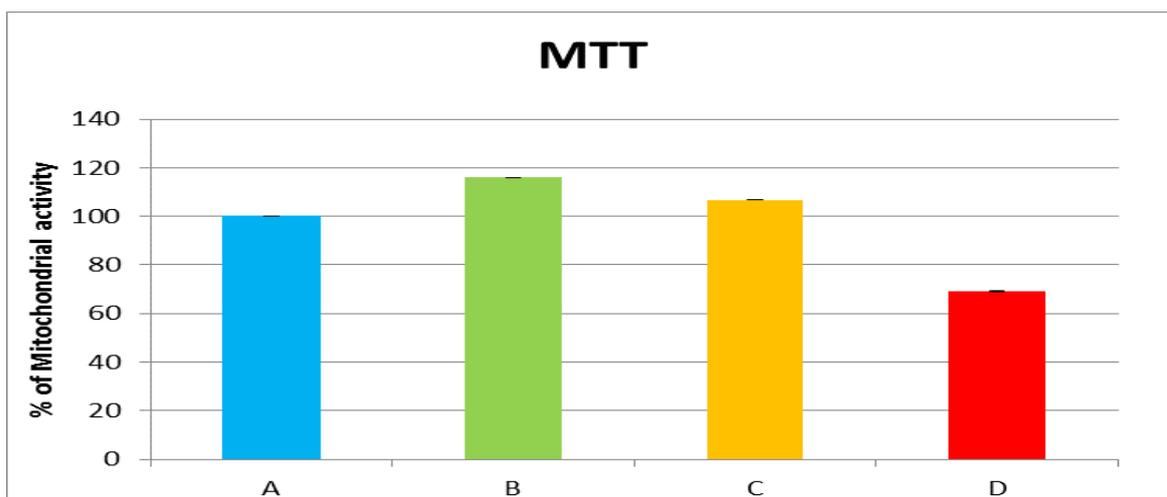


Figura 2 – Dosagem de MTT nas culturas de astrocitos. A: controle; B: tratadas com 0,1% de própolis; C: culturas infectadas com *N. caninum* e D: tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum*.

3.2. Proliferação parasitária

As culturas que foram tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum* (296×10^3 taq/ml) apresentaram uma redução significativa no número total de taquizoítos 60 horas após a infecção, quando comparadas às culturas apenas infectadas com *N. caninum* (442×10^3 taq/ml). (Figura 3).

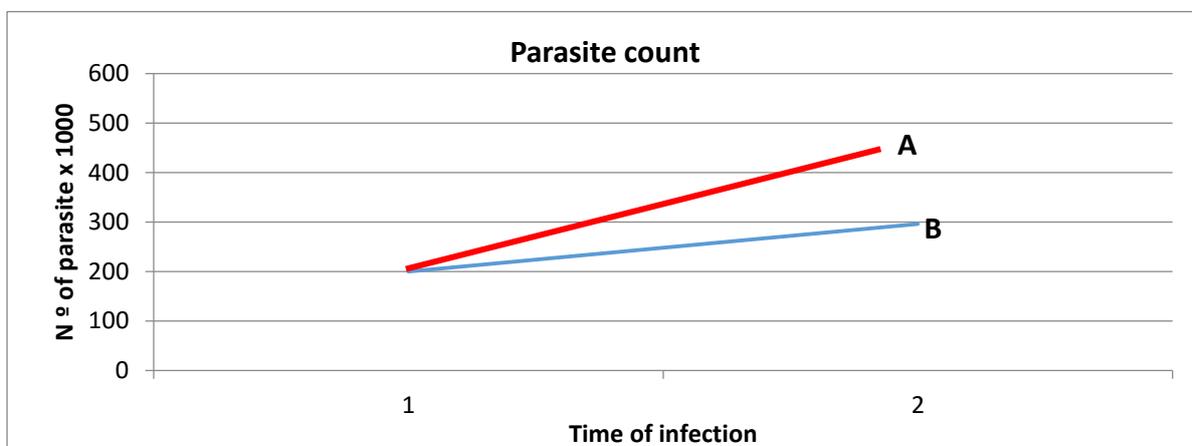


Figura 3 - Total de taquizoítos utilizados na infecção (1) e 60h após a infecção (2), A - culturas infectadas com *N. caninum*; B - culturas tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum* $p < 0.05$.

3.3. Produção de óxido nítrico

Neste estudo observou-se que as culturas que foram tratadas com 0,1% de própolis apresentaram aumento na produção de NO de 30%, quando comparadas ao controle, já nas culturas que foram tratadas e infectadas este aumento foi superior a 70% em comparação com o grupo controle. Comparando-se as culturas infectadas com aquelas que foram tratadas e infectadas este aumento foi de 82%. (Figura 4).

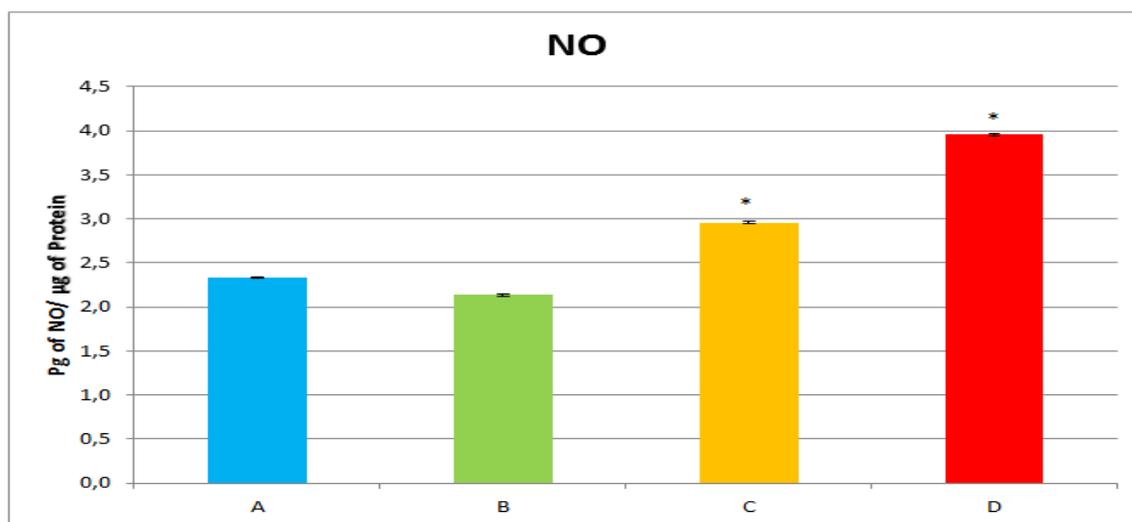


Figura 4 - Produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas. A: controle; B: tratadas com 0,1% de própolis; C: culturas infectadas com *N. caninum* e D: tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum*.

3.4. Imunocitoquímica

A determinação de GFAP através de imunocitoquímica mostrou que, as células do controle (Figuras 5A e B), expressam GFAP em todo corpo celular, caracterizando seu fenótipo estrelado. Observou-se alterações morfológicas nos grupos testados, quando comparados com o grupo controle, onde, as culturas infectadas com o *N. caninum* (Figura 5C) apresentaram redução do corpo celular e aumento no número de prolongamentos, enquanto que, nas culturas tratadas com própolis (Figura 5D) houve redução bastante acentuada do corpo celular e na expressão de GFAP.

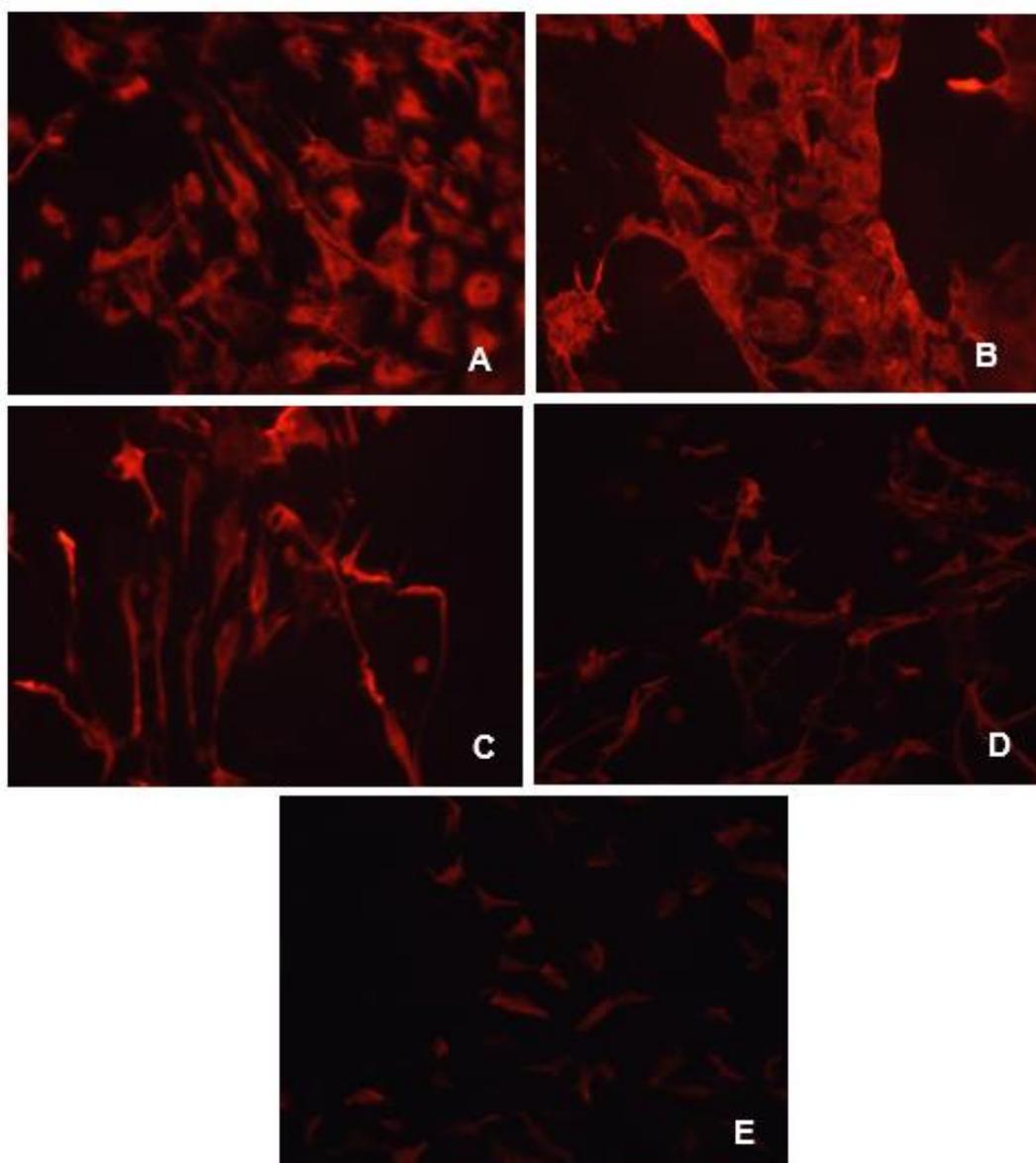


Figura 5 – Imunocitoquímica de astrócitos A e B- controle; C- infectadas com *N. caninum*; D- tratadas com 0,1% de própolis e E – tratadas com 0,1% de própolis e infectadas com *N. caninum*.

4. DISCUSSÃO

A própolis é um dos muitos produtos naturais que vem sendo utilizado durante séculos pela humanidade, devido seu amplo espectro de atividades biológicas (VARGAS et al., 2004; SCHNITZLER et al., 2010b), dentre elas a ação antiprotozoário, (ODA et al., 2011). Nesse estudo, culturas de astrócitos que foram tratadas com própolis apresentaram uma redução significativa no número

de parasitos, conforme mostra a figura 3, além de aumento na produção de NO, em culturas tratadas com 0,1% de própolis e infectadas (figura 4). Também se observou aumento na atividade mitocondrial das culturas que foram tratadas com própolis, (figura 2).

A ação farmacológica da própolis tem sido atribuída aos compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos, no entanto sua atividade farmacológica pode estar associada ao sinergismo entre seus diferentes compostos (MENEZES, 2005; BURIOL et al., 2009). Os principais compostos químicos isolados da própolis podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, além de diversos minerais (MENEZES, 2005).

A atividade antiprotozoário da própolis já foi demonstrada contra *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas* spp. e *Giardia lamblia*, além de *Trypanosoma cruzi* (PRYTZYK et al., 2003; DANTAS et al., 2006). Essa atividade pode estar relacionada à presença de derivados do ácido cafeoilquínico, que intensificam a propagação e a motilidade dos macrófagos, indicando que a própolis esteja associada à atividade imunoestimulatória. Além disso a própolis estimula a síntese de óxido nítrico pelos macrófagos, o que os torna mais sensíveis ao estímulo de substâncias como o INF- γ , importante para a resposta imunológica (ORSIN et al., 2000). O que corrobora os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que, as culturas que foram tratadas com própolis apresentaram uma redução acentuada no número de parasitos, 60 horas após a infecção. Também observamos que, aquelas culturas que foram tratadas com própolis e foram infectadas, apresentaram um aumento de 82% na produção de NO, quando comparadas àquelas que foram infectadas, mas que não receberam tratamento. Orsolic et al (2004), também detectaram aumento na produção de NO em macrófagos, ao pesquisarem os efeitos de uma amostra croata de própolis.

Ao investigarem o efeito da própolis na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos em ensaios *in vivo*, Orsi et al. (2000), observaram indução na produção de óxido nítrico de maneira dose dependente. A produção de NO foi

estimulada nos macrófagos quando os animais eram tratados com as concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL de própolis e inibida nas concentrações de 3000 e 6000 µg/mL, sugerindo que a própolis apresenta um importante papel na imunidade não específica, por ativar macrófagos.

No que se refere à estabilidade das membranas, comparando-se as culturas tratadas com o controle (figura 1), observa-se que as culturas que receberam tratamento, não apresentaram lesão de membrana. Uma vez que a própolis possui uma extensa gama de compostos com atividade antioxidantes, além dos polifenóis, (MARQUELE et al., 2005), talvez a prevenção da oxidação lipídica promovida por esses antioxidantes, tenha permitido a manutenção, na estabilidade das membranas celulares, nas culturas que receberam tratamento.

Observou-se que, nas culturas infectadas com *N.caninum*, houve um aumento no metabolismo mitocondrial. Esse aumento pode ter ocorrido como resposta a infecção, uma vez que, esses parasitos são capazes de estimular a resposta imune celular e humoral. Os astrócitos contribuem de forma ativa para a resposta imune do SNC contra agentes infecciosos (TUO et al., 2005). Um resultado semelhante foi encontrado por Lima, (2012) quando infectou culturas mistas de astrócitos e micróglia de ratos (*Rattus norvegicus*), com *N.caninum*. Tanto os astrócitos quanto a micróglia, são células que respondem à danos no SNC. (GIULIAN, 1994; FISCHER, 2001).

As culturas que foram apenas tratadas com própolis, também apresentaram aumento no metabolismo mitocondrial. Gonçalves, (2011) também observou aumento no metabolismo de astrócitos de ratos (*Rattus norvegicus*), que foram tratados com mel, que assim como a própolis é um produto natural, produzido pelas abelhas de composição bastante complexa (MENDES et al., 2009). Em 2010, Matos analisou a ação de flavonóides na potencialização da resposta das células gliais à infecção por *N. caninum* e sugeriu que os flavanoides podem ter promovido aumento na taxa de conversão do MTT, através da indução do aumento de atividade metabólica das células gliais, principalmente astrócitos, associada à indução de proliferação da microglia. Desta forma o aumento no metabolismo mitocondrial em células tratadas com própolis, pode ser justificado, devido à presença de diversos flavanoides em sua composição (HU et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005).

A capacidade da própolis em inibir o crescimento de microorganismos é a atividade farmacológica mais popularmente conhecida e comprovada cientificamente. A eficácia antiprotozoário da própolis, foi demonstrada em testes *in vitro* onde culturas de macrófagos foram infectados pelo protozoário *Leishmania amazonenses* e foi observada uma redução da carga parasitária. (AYRES et al., 2007). Os mecanismos pelos quais o extrato de própolis exerce o efeito leishmanicida *in vivo* não são claros. No entanto sugere-se que o efeito leishmanicida da própolis pode ser devido, pelo menos em parte, à ativação de macrófagos. Uma vez que, estes, estão envolvidos em muitas funções, como fagocitose, liberação de enzimas, geração de radicais livres e mediadores de processos inflamatórios, (ODA, et al., 2011).

Os resultados desse estudo demonstraram que, as culturas de astrócitos tratadas com 0,1% de própolis, apresentaram uma redução significativa na proliferação de parasitos, elevação na produção de NO, nas culturas tratadas e infectadas e aumento no metabolismo mitocondrial das culturas que receberam tratamento. Esses resultados demonstram que a própolis pode exercer um papel antiprotozoário contra *Neospora caninum*, no entanto mais estudos são necessários para se elucidar os mecanismos de ação deste produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADREOTTI R.; BARROS J. C.; PEREIRA A. R.; OSHIRO L. M.; CUNHA R. C.; FIGUEIREDO NETO L. F. 2010. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**. Vet. 19:119-123.
- AYRES DC, MARCUCCI MC, GIORGIO S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 102: 215-220, 2007.
- BURIOL L.; FINGER D.; SCHMIDT E. M.; SANTOS J. M. T; ROSA MR, QUINÁIA S. P; TORRES Y.R, SANTA H. S. Z.; PESSOA C.; MORAES M. O.; COSTA-LOTUFO L. V.; FERREIRA P. M. P, SAWAYA A.CHF, EBERLIN M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova** 32: 296-302, 2009.
- CUETO A.P; ALVES S.H; PILAU M; WEIBLEN R; KUBIÇA T.F; LOVATO L.T. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciencia Rural**. 2011;41(10):1800-06.

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.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

FISCHER, H. G.; REICHMANN, G. Brain dendritic cells and macrophages / microglia in central nervous system inflammation. **J. Immunol.**, v. 166(4), p. 2717-26, 2001

GIULIAN, D.; LI, J.; LEARA, B.; KEENEN, C. Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. **Neurochem Int.**, v. 25(3), p. 227-33, 1994.

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, n. 1, p. 1-7, 2001.

GONÇALVES, C. O. J. Potencial modulatório do mel de jataí (*tetragonista angustula*) em culturas de astrócitos de ratos infectadas in vitro com *Neospora caninum*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológica, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2011.

HAYACIBARA M. F.; KOO H.; ROSALEN P.L.; DUARTE S.; FRANCO E. M.; BROWEN W. H.; IKEGAKI M.; CURY J. A. 2005. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol** 101: 110-115.

HU F.; HEPBURN H. R.; LI Y.; CHEN M.; RADLOFF S. E.; DAYA S. 2005. Effects of ethanol and water extracts of própolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol** 100: 276-283.

JESUS, E. E. V. Imunopatogênese da infecção por *Neospora caninum* em células do Sistema Nervoso Central: o papel imunomodulatório das células da glia na proteção neuronal. 2011. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2011.

JESUS, E. E.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, A. B.; FREIRE, S. M.; TARDY, M. B.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, S. L.; COSTA, M. F. Effects of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 269-74, 2013.

KAMGA-WALADJO A. R.; GBATI O. B.; KONE P.; LAPO R. A.; CHATAGNON G.; BAKOU S. N. PANGUI L. J.; DIOP PEL H.; AKAKPO JÁ, TAINTURIER D. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. **Trop Anim Health Prod.** 2010:42:953-9.

LANGONI, H.; DA SILVA, A. V.; KATAGIRI, S.; CAGNINI, F.; RIBEIRO, C. M. Infecção por *Neospora caninum* e suas implicações na performance reprodutiva de bovinos leiteiros. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 1, 2014.

LIMA, O. C. A. Estudos de citotoxicidade celular em culturas Mistas de ratos infectadas *in vitro* com *neospora Caninum* e tratadas com mel de jataí (*tetragonisca Angustula*) 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológica, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2012.

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

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M.; FONSECA, M. J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.3/4, p.455-462, 2005

MESQUITA L. P.; NOGUEIRA C. I.; COSTA R. C.; ORLANDO D. R.; BRUHN F. R. P.; LOPES P.F.R., NAKAGAKI K.R.Y., PECONICK A.P., SEIXAS J.N., BEZERRA JÚNIOR P.S., RAYMUNDO D.L. & VARASCHIN M.S. 2013. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.** 196:327-332.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 72, 3, 2005, pp. 405-411.

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

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 6, n. 2, 205-219, 2000.

ORSOLIC, N.; KNEZEVI, A.H.; SVER, L.; TERZI, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.307- 315, 2004.

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

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.

SCHNITZLER, P. et al. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytother Res**, v.24, n.1, p.20-28, 2010a. doi: 10.1002/ptr.2868.

VARGAS A. C; LOGUERCIO A. P; WITT N.M; DA COSTA M. M; SÁ E SILVA M; VIANA L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural** 34: 159-163. 2004.

VARASCHIN M.S.; HIRSCH C.; WOUTERS F.; NAKAGAKI K. R. Y.; GUIMARÃES A. M.; SANTOS D. S.; BEZERRA JÚNIOR P. S., COSTA R.C., PECONICK A.P. & LANGOHR I.M. 2012. Congenital Neosporosis in Goats from the State of Minas Gerais, Brazil. Korean **J. Parasitol.** 50:63-67.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo, demonstraram que as culturas de astrócitos tratadas com 0,1% de própolis, apresentaram uma redução significativa na proliferação de parasitos, elevação na produção de NO, nas culturas tratadas e infectadas e aumento no metabolismo mitocondrial das culturas que receberam tratamento.

Pode-se sugerir, que a própolis exerça um papel antiprotozoário contra *N. caninum*, no entanto é necessária a realização de mais estudos, afim de se elucidar os mecanismos de ação deste produto. Principalmente no que se refere a sua ação antiprotozoário. Uma vez que, trata-se de um produto natural, de composição bastante diversificada, faz-se necessário análises, que caracterizem de forma detalhada a composição deste produto, que, devido as suas diversas propriedades farmacológicas, comprovadas, mostra-se como uma alternativa promissora ao tratamento de diferentes patologias.

ANEXOS

Anexo A

Normas editoriais

Artigo completo

- 1 - Ser escrito em língua inglesa.
- 2 - Limitar-se ao máximo de dez páginas digitadas, não sendo contadas apenas as páginas onde constem tabelas e ilustrações.
- 3 - Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo.
- 4 - Ser estruturado dentro dos seguintes itens: a) Introdução; b) Materiais e Métodos; c) Resultados; d) Discussão (se conveniente, é possível a associação dos tópicos "Resultados" e "Discussão"); e) Agradecimentos; f) Referências; g) Resumo/Palavras-chave; Abstract/Keywords.
- 5 - Apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, nos idiomas inglês e português, não devendo ultrapassar 250 (duzentas e cinquenta) palavras, seguidos das palavras-chave/Keywords, limitadas a cinco, que correspondem a palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo.

Apresentação dos trabalhos

- 1 - **Digitação:** obrigatoriamente, em formato A4 (21,0 x 29,7cm), espaço 1,5, margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas. Todas as Ilustrações devem conter título, fonte e, caso necessário, legenda. O texto dos artigos deve ser apresentado utilizando-se as extensões: doc, rtf ou odt;
- 2 - **Página de rosto:** elemento obrigatório, onde deve conter o título do artigo (Português e Inglês), nomes por extenso dos autores, instituições de origem e endereço de email de todos os autores.
- 3 - **Tabelas:** devem ser numeradas em algarismos arábicos e encabeçadas por um título, seguido de local e data. Na montagem das tabelas seguir: IBGE. **Normas de apresentação tabular**. 3. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61 p. O limite de tabelas por trabalho é de cinco. Em casos excepcionais, conhecida a opinião da comissão editorial, este número poderá ser ultrapassado. No texto devem ser indicadas pela palavra tabela (por extenso).
- 4 - **Ilustrações** (fotografias, gráficos, quadros, desenhos ou esquemas): devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas no texto. As ilustrações devem ser identificadas com o título e fonte. Fotos devem ter resolução mínima de 300 dpi's. As legendas de ilustrações coloridas devem estar referenciadas somente por setas, símbolos e pontos quando publicadas em preto e branco. Os gráficos devem trazer sempre os valores numéricos que lhes deram origem. Desenhos e esquemas devem apresentar boa qualidade técnica e artística. Para citar as ilustrações no texto indicar a nomenclatura por extenso conforme segue: se estiver entre parênteses utilizar letra maiúscula na inicial da palavra, ex: (Figura 1) e minúsculas se estiver inserida no texto, ex. figura 1. Indicar junto ao título da ilustração o local e data. Logo abaixo da ilustração indicar a fonte de origem mesmo sendo de autoria própria. As ilustrações serão publicadas coloridas na revista eletrônica, na revista em papel serão publicadas em preto e branco. Desta forma, recomendamos cuidados especiais para que seja possível uma boa leitura da imagem mesmo em preto e branco.
- 5 - **Agradecimentos:** a critério dos autores.
- 6 - **Referências:** As referências são organizadas por ordem alfabética e reunidas no final do trabalho. São digitadas com espaçamento simples, alinhadas à esquerda e não devem ser justificadas. Devem ser relacionados todos os autores, não usar a expressão et al. Os títulos de periódicos devem ser mencionados por extenso. As referências devem seguir a normalização da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023, que deve ser consultada para outros tipos de documentos aqui não exemplificados