

EFEITO ADJUVANTE DA PRÓPOLIS MARROM EM VACINA VIVA COM ANTÍGENOS MÚLTIPLOS

**FERREIRA, L.N.¹; FONSECA, P.F.^{2*}; CAETANO, C.F.¹; SIEDLER, B.S.²;
MUNHOZ, L.S.²; VILELA, C.O.¹; FISCHER, G.³; VARGAS, G.D.⁴; VIDOR, T.⁴,
HÜBNER, S.O.⁴**

¹Pós-Graduanda pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária

² Graduanda de Medicina Veterinária UFPel

³ Pós-Doutorando UFRGS

⁴ Professor Adjunto / Departamento de Veterinária Preventiva / UFPel

RESUMO

Os adjuvantes imunológicos são substâncias capazes de induzir ou aumentar as respostas imunológicas inatas e/ou adaptativas. A própolis foi comprovada por alguns pesquisadores como sendo uma substância imunoestimulante por possibilitar um incremento na produção de anticorpos em função do seu potente efeito em diferentes células do sistema imune inato. No entanto, para o seu uso como adjuvante na produção de vacinas, muitas pesquisas ainda devem ser feitas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade imunomoduladora dos extratos aquosos de própolis marrom quando associados com as vacinas vivas com antígenos múltiplos. Camundongos Swiss (*Mus musculus*) foram vacinados com duas doses de uma vacina comercial polivalente atenuada. Foram testadas três contrações diferentes da vacina com e sem própolis. Trinta dias após a segunda vacinação, foi realizada a coleta de sangue. A titulação de anticorpos contra o parvovírus canino foi realizada pela técnica de ELISA indireto. Os grupos que receberam as concentrações mais altas da vacina ($1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 TCD₅₀) acrescidas de 400 µg de própolis apresentaram incremento significativo na resposta imune humoral quando comparados aos grupos que receberam as mesmas doses da vacina sem própolis. Esse resultado vem confirmar que a própolis marrom possui efeito adjuvante, justificando assim as pesquisas nessa área.

1.INTRODUÇÃO

A utilização de vacinas é uma prática comum na prevenção de doenças e minimização dos sinais clínicos causados por infecções e agentes parasitários em humanos e animais (Singh & O'hagan, 2002). No entanto, muitas vacinas requerem a associação com substâncias adjuvantes que, combinadas ao antígeno, incrementam a sua imunogenicidade, potencializando as respostas imunes celular e humoral (Barr et al., 2006). Os adjuvantes imunológicos também podem ser usados para prolongar a resposta imune e estimular a imunidade de mucosa. Embora muitas substâncias tenham sido avaliadas quanto a sua capacidade adjuvante, em geral a produção de vacinas continua dependente do uso de sais de alumínio (Leclerc, 2003) ou emulsões oleosas, específicas para vacinas de uso veterinário (Jansen et al., 2006).

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas e que apresenta atividade biológica contra vírus, bactérias, fungos, protozoários e células tumorais (De Castro, 2001). Esse produto natural também se comporta

Laboratório de Imunologia e Virologia, Faculdade de Veterinária, UFPel, Campus Universitário, Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

como agente analgésico e antiinflamatório (De Campos et al., 1998). Mesmo com a demonstração da atividade imunomoduladora (Orsi et al., 2000; Fischer et al., 2007a), muitos mecanismos de ação ainda são desconhecidos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade imunomoduladora dos extratos aquosos de própolis marrom quando associados com vacinas vivas com antígenos múltiplos, comumente utilizados na imunização de caninos. O modelo biológico utilizado foi o camundongo, avaliando-se parâmetros da resposta imune humoral, através da determinação de títulos de anticorpos contra parvovírus canino.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

Extrato aquoso de própolis marrom

A própolis marrom foi obtida da Apis Nativa Produtos Naturais Indústria e Comércio Ltda e armazenada a -20°C . O extrato aquoso foi obtido seguindo-se metodologia conhecida e após liofilizado (Edwards High Vacuum, número de série 143). O liofilizado foi suspenso em meio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, SIGMA, EUA) a uma concentração de 100 mg/ml e filtrado em filtro milipore.

Vacinas e inoculações

A avaliação das propriedades adjuvantes do extrato aquoso da própolis marrom foi feita através da associação com uma vacina comercial viva com antígenos múltiplos, utilizada para caninos. Essa vacina contém os vírus vivos da cinomose, hepatite infecciosa dos cães, adenovírus canino tipo 2, parainfluenza e parvovírus canino liofilizados, além do concentrado lisado de *Leptospira canicola* e *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Esse liofilizado foi ressuspendido em um diluente que contém o antígeno de coronavírus, inativado por irradiação ultravioleta. No entanto, os parâmetros analisados nesse experimento foram apenas em relação ao antígeno parvovírus.

Nesse estudo, foram usados 80 camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, soronegativas para o parvovírus canino (CPV) através do teste de ELISA. O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada. Esse experimento contou com oito grupos de dez animais, divididos aleatoriamente. Os grupos 1 e 2 foram os controles negativos, sendo as inoculações feitas com DMEM e DMEM mais 400 µg de própolis marrom, respectivamente. Já os grupos 3, 4 e 5 receberam apenas vacina comercial nas doses $0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 TCDI₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares / 25 µl), respectivamente. Enquanto, os grupos 6, 7 e 8 receberam diferentes doses da vacina ($0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 TCDI₅₀, respectivamente) acrescida de 400 µg de própolis marrom. Foram realizadas duas inoculações em intervalos de trinta dias (dia 0 e 30), a via de aplicação foi a subcutânea na região pré-escapular. A utilização dos modelos biológicos foi aprovada pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEa/UFPel).

Sorologia

Amostras individuais de soro foram coletadas, trinta dias após a segunda inoculação, e mantidas a -70°C até o momento da titulação dos anticorpos. Os anticorpos contra o CPV foram titulados através do teste de ELISA indireto, de acordo com o método descrito por Voller et al (1978), com pequenas adequações. Resumidamente, placas de poliestireno contendo 96 cavidades foram sensibilizadas com CPV, diluído 1:1000 em tampão carbonato, pH 9,6. Após um período de 12 horas de incubação a 4°C , foram acrescentados os soros dos camundongos, em duplicata, diluídos em solução salina tamponada com Tween 80 (PBS T80). As diluições foram de 1:50 até 1:6400. Foram adicionados controles positivos (soro obtido de hiperimunização de camundongos com CPV) e negativos (soro de camundongo não inoculado) para cada placa. Na seqüência foi colocado o conjugado de cabra anti-imunoglobulina de camundongo, marcado com peroxidase. A solução cromógena foi, então, preparada, adicionada às placas e essas incubadas no escuro por 10 minutos. As placas foram, então, levadas até o leitor de ELISA e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 450 nm para análise da absorbância.

Análise Estatística

Os títulos de anticorpos foram comparados usando análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi realizado para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada tratamento, usando programa SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média \pm desvio padrão do título de anticorpos (em absorbância) de cada tratamento está representada na Figura 1. Como era esperado, os grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 diferiram significativamente em relação aos grupos 1 e 2, controles. O grupo 6, que foi inoculado com $0,75 \times 10^6$ TCID₅₀ da vacina acrescida de 400 μg de própolis marrom, não diferiu significativamente do grupo 3, que recebeu a mesma dose de antígeno, porém sem própolis. No entanto, os grupos 7 e 8 apresentaram incremento significativo ($p < 0,05$) na resposta imune humoral quando comparados aos grupos 4 e 5, respectivamente. Esses grupos receberam diferentes doses da vacina comercial, enquanto aqueles receberam vacina acrescida de 400 μg de própolis marrom. Esses resultados sugerem melhor desempenho dos tratamentos com própolis. Além disso, o fato do grupo 6 não ter diferido significativamente do grupo 3, permite concluir que o efeito adjuvante da própolis marrom pode estar relacionado a dose do antígeno.

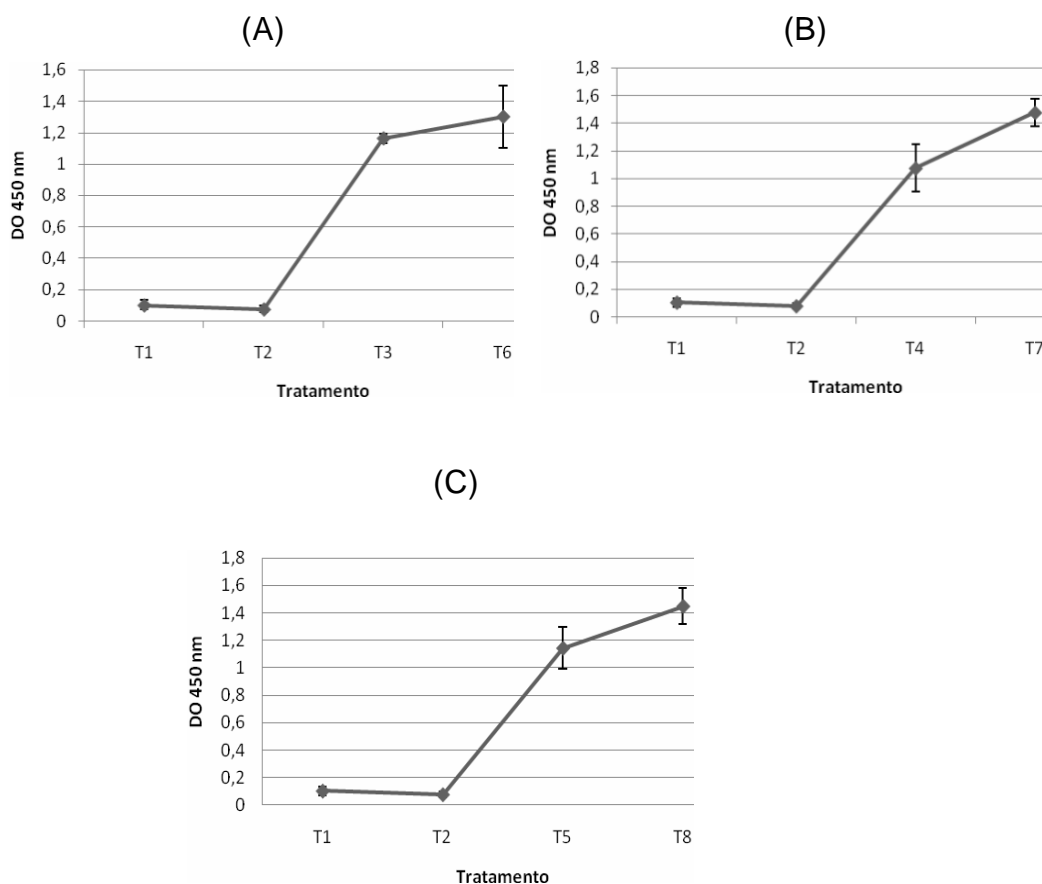


Figura 1: Média \pm desvio padrão da densidade óptica, na diluição 1:50. (A) comparação entre controles (T1 e T2), grupo que recebeu $0,75 \times 10^6$ TCID₅₀(T3) e grupo com $0,75 \times 10^6$ TCID₅₀ mais 40 μ g de própolis marrom (T4). (B) comparação entre controles (T1 e T2), grupo que recebeu $1,5 \times 10^6$ TCID₅₀(T4) e grupo com $1,5 \times 10^6$ TCID₅₀ mais 40 μ g de própolis marrom (T7). (C) comparação entre controles (T1 e T2), grupo que recebeu $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀(T5) e grupo com $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀ mais 40 μ g de própolis marrom (T8). Resultados determinados por ELISA, 30 dias após a segunda inoculação.

O efeito adjuvante da própolis verde já foi comprovado em outros experimentos que utilizaram vacinas inativadas. Segundo Fischer et al., (2007a), os extratos etanólicos da própolis verde incrementam a resposta imune humoral de bovinos, quando associados com vacina oleosa inativada contra o herpesvírus bovino tipo 5, demonstrando ação adjuvante. Além disso, quando estes pesquisadores imunizaram camundongos com uma vacina inativada contra o herpesvírus suíno tipo 1, acrescida de hidróxido de alumínio ou hidróxido de alumínio e própolis, observou-se o incremento na resposta imune celular dos animais que receberam a vacina contendo própolis (Fischer et al., 2007b). Apesar de estes estudos indicarem a capacidade imunomoduladora da própolis associada a antígenos inativados, os efeitos do acréscimo da própolis marrom a vacinas vivas e a vacinas com antígenos múltiplos permaneciam desconhecidos.

4. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que os extratos aquosos de própolis marrom incrementam a resposta imune humoral contra o CPV, quando acrescentados a vacinas vivas com antígenos múltiplos nas doses de $1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 TCID₅₀, mostrando efeito adjuvante.

Tendo em vista os benefícios que o uso de adjuvantes obtidos a partir de substâncias naturais pode trazer à vacinologia, outras pesquisas já estão sendo realizadas no Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPel. Estão sendo avaliados os efeitos imunomoduladores da própolis marrom e da própolis verde em relação à imunidade humoral e celular contra diferentes antígenos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barr, T.A., Carling, J., Heath, A. W., 2006. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine* 24, 3399 – 3407.

De Campos, R.O., Paulino, N., da Silva, C.H., Scremin, A., Calixto, J.B., 1998. Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 1187-1193.

De Castro, S.L., 2001. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annu. Rev. Biomed. Sci.* 3, 49-83.

Fischer, G., Cleff, M.B., Dummer, L.A., Paulino, N., Paulino, A.S., Vilela, C.O., Campos, F.S., Storch, T., Vargas, G.D., Hübner, S.O., Vidor, Telmo, 2007. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116, 79-84.

Fischer, G., Conceição, F.R., Leite, F.P.L., Dummer, L.A., Vargas, G.D., Hübner, S.O., Dellagostin, O.A., Paulino, N., Paulino, A.S., Vidor, Telmo, 2007. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 25, 1250-1256.

Jansen, T., Hofmans, M.P.M., Theelen, M.J.G., Manders, F., Schijns, V.E.J.C., 2006. Structure and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. *Vaccine* 24, 5400-5405.

Leclerc, C., 2003. New approaches in vaccine development. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 329-341.

Orsi, R.O., Funari, S.R.C., Soares, A.M.V.C., Calvi, S.A., Oliveira, S.L., Sforcin, J.M., Bankova, V., 2000. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J. Venom. Anim. Toxins* 6, 205-219.

Singh M, O'hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res* 2002; 19(6): 715-28.

VOLLER A. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *Ric Clin Lab* 1978; 8(4): 289-98.