

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



IMUNOMODULAÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E AQUOSO DE PRÓPOLIS MARROM EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM ANTÍGENOS MÚLTIPLOS

FINGER, Paula Fonseca; FERREIRA, Lilian das Neves; MUNHOZ, Livia Silveira; SIEDLER, Bianca Sica; SILVA, Luis Gustavo Crochemore; NUNES, Cristina Freitas; CASTRO, Clarissa Caetano; VARGAS, Gilberto D'Ávila; FISCHER, Geferson; HÜBNER, Silvia de Oliveira.

Laboratório de Virologia e Imunologia - Faculdade de Veterinária - UFPel Campus Universitário, Caixa Postal 354, 96010-900 paulaafinger@hotmail.com

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). 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). Contudo, tem sido crescente o interesse pela avaliação de substâncias naturais com potencial adjuvante, como os extratos derivados de plantas, cujo incremento nas respostas imune humoral e celular já foi descrito por Fischer e Vidor (2008). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom, quando associados com uma vacina composta por antígenos múltiplos. Para tal, foram analisados parâmetros da resposta imune humoral em relação ao parvovírus canino e coronavírus canino, utilizando-se camundongo como modelo biológico.

METODOLOGIA

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 já conhecida e após liofilização foi suspensa 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 (0,45nm).

Foram utilizados 120 camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, com quatro a seis semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). A condução do experimento foi aprovada pela comissão

de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEa/UFPel).

A avaliação das propriedades adjuvantes dos extratos etanólico da própolis verde e aquoso da própolis marrom foi feita através da sua co-administração com uma vacina comercial contendo antígenos múltiplos, utilizada para caninos. A vacina continha sete antígenos vivos atenuados, incluindo o parvovírus canino (CPV), e um diluente contendo o antígeno de coronavírus canino (CCoV) inativado por irradiação ultravioleta, os quais foram avaliados quanto a parâmetros das respostas imunes humoral.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 12 grupos de dez animais. Os grupos 1, 2 e 3 (controles negativos), foram inoculados com solução salina tamponada (PBS), PBS acrescida de 400 µg/dose de própolis verde e PBS acrescido de 400 µg/dose de própolis marrom, respectivamente. Os grupos 4, 5 e 6 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. Os animais dos tratamentos 7, 8 e 9 receberam as diferentes doses da vacina ($0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 TCDI₅₀, respectivamente) acrescidas de 400 µg/dose do extrato etanólico de própolis verde, enquanto que os demais (grupos 10, 11 e 12) foram inoculados com a vacina de antígenos múltiplos ($0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 TCDI₅₀, respectivamente) associada a 400 µg/dose de extrato aquoso de própolis marrom. Foram realizadas três inoculações com intervalos de 30 dias por via subcutânea, na região pré-escapular. A coleta de sangue para mensuração dos títulos de anticorpos foi realizada 21 dias após a terceira inoculação, através de punção do plexo venoso retro-ocular, com os animais previamente anestesiados (AAALAC & COBEA, 2003). As amostras de soro foram inativadas a 56°C por trinta minutos, e armazenadas a -70 °C até o momento do uso.

O teste de ELISA indireto foi realizado para mensurar os níveis de anticorpos, IgG totais, contra o CPV e o CCoV, de acordo com o método descrito por Voller (1978) e por Pratelli et al. (2002), com pequenas adequações. A obtenção dos antígenos para sensibilização das placas foi feita através da infecção de culturas de células Crandell de rim de felino (CrFK) com CPV cepa Cornell (ATCC-VR 2017) ou CCoV cepa Mav 795 (cedida pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria - Brasil). Após 24 horas de infecção, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 250 x g por 20 minutos para remoção de restos celulares. O sobrenadante do centrifugado de CPV foi diluído 1:200 em tampão carbonato (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM [pH 9,6]). Já o CCoV foi novamente centrifugado (140000 x g), a 4 °C, durante uma hora. O precipitado obtido foi ressuspenso em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2) em uma diluição de 1:80 do volume inicial. Essa suspensão foi diluída a 1:800 em tampão carbonato (pH 9,6). O teste foi realizado em placas de poliestireno contendo 96 cavidades, sensibilizadas com CPV (1:200) ou CCoV (1:800). Após um período de 12 horas de incubação a 4°C, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 80 (PBS T80) e as reações inespecíficas bloqueadas por incubação durante 1 hora a 37 °C com soro fetal bovino 5% em PBS T80. Os soros dos camundongos foram acrescidos em duplicata, diluídos 1:50 em PBS T80 (CPV) ou em PBS T20 (CCoV). Na seqüência foi colocado o conjugado de cabra anti-imunoglobulina G (IgG) de camundongo, marcado com peroxidase (Sigma). Após uma hora, a solução cromógena (OPD) foi adicionada às placas e essas incubadas por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor Thermo Plate (TP-Reader) nos comprimentos de onda 450 nm para CPV e 405 nm para CCoV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da resposta humoral através do teste de ELISA revelou que todos os tratamentos com própolis marrom apresentaram efeito adjuvante significativo ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos apenas com a vacina comercial. No entanto, na concentração de $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ o seu efeito imunoestimulante foi mais pronunciado. Já a própolis verde demonstrou efeito adjuvante significativo ($p < 0,05$) apenas no grupo inoculado com a maior concentração de antígenos (3×10^6 TCDI₅₀). Esses dados sugerem atividade imunoestimulante da própolis marrom e verde, sendo que para a própolis verde este efeito foi dependente do título do antígeno utilizado. Além disso, indicam melhor desempenho da amostra marrom em relação à verde na estimulação da resposta humoral contra o CPV. Conforme esperado, nos grupos controle (1, 2 e 3) não houve estímulo à produção de anticorpos.

Após 21 dias da inoculação, pode-se observar efeito adjuvante significativo da própolis marrom em relação aos grupos que receberam somente antígenos, nas concentrações de $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ e 3×10^6 TCDI₅₀. Este efeito foi diretamente proporcional à dose dos antígenos. No entanto, nos grupos tratados com $0,75 \times 10^6$ TCDI₅₀ dos antígenos co-administrados com própolis verde ou marrom, o antígeno, administrado isoladamente, demonstrou-se superior aos adjuvantes avaliados ($p < 0,05$). A utilização de própolis verde não demonstrou efeito imunoestimulante para CCoV, em comparação aos demais tratamentos. Os grupos que receberam os antígenos diferiram de forma significativa em relação aos controles (1, 2 e 3).

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram que o extrato aquoso de própolis marrom possui atividade adjuvante sobre a resposta imune humoral, contra o CPV atenuado e o CCoV inativado, quando incorporado a uma vacina múltipla. Já o extrato etanólico de própolis verde incrementou a resposta humoral contra o CPV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAALAC, COBEA 2003. Manual Sobre Cuidados E Usos De Animais De Laboratório – Edição Em Português [Cited 2007 Aug 24]. Available From: <http://www.nap.edu/catalog/11441.html>.
- Barr, T.A., Carlring, J., Heath, A. W., 2006. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine* 24, 3399 – 3407.
- Fischer, G., Vidor, T.; Scientific Evidence of the Use of de Propolis in Ethnomedicine, In: Propolis as an immune system modulator substance. Editora Transworld Research Network, Índia, 2008, 137- 140.
- Jansen, T., et al., 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.
- Pratelli A, Elia G, et al. Prevalence Of Canine Coronavirus Antibodies By Na Enzyme-Linked Immunosorbent Assay In Dogs In The South Of Italy. *J Virol Meth* 2002; 102: 67-71.

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.