

IMUNOMODULAÇÃO DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE O PARVOVÍRUS CANINO (CPV) E O CORONAVÍRUS CANINO (CCoV) ASSOCIADOS A ANTÍGENOS MÚLTIPLOS

SILVA, Luis Gustavo Crochemore da Silva; SIEDLER, Bianca Sica; CASTRO, Clarissa Caetano; FINGER, Paula Fonseca
Universidade Federal de Pelotas

HÜBNER, Silvia de Oliveira
Universidade Federal de Pelotas
gugacrochemore@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

As vacinas com antígenos múltiplos têm representado um grande avanço na imunização de animais, visto que aliam economias de tempo, custo e manejo. No entanto, a eficiência dessas vacinas tem sido por vezes questionada, e a administração associada a um adjuvante ou a um imunomodulador adequado poderia significar um melhor desempenho destas vacinas (Heldens *et al.*, 2008). Nesse contexto, a própolis surge como uma candidata em potencial, uma vez que diversas pesquisas vêm demonstrando suas atividades estimulantes sobre o sistema imune humoral (Sforcin *et al.*, 2005; Chu, 2006; Fischer *et al.*, 2007a; Fischer *et al.*, 2007b) e celular (Fischer *et al.*, 2007a; Fischer *et al.*, 2007b).

A própolis verde é produzida predominantemente a partir de uma planta nativa da região sudeste do Brasil, conhecida popularmente como alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*). Trabalhos recentes têm identificado predominância de compostos fenólicos em várias amostras de própolis brasileira, especialmente a própolis verde (Fischer *et al.*, 2008). Compostos fenólicos (flavonóides, ácidos aromáticos e diterpênicos) são os principais componentes responsáveis pelas atividades biológicas da própolis, dentre as quais se destacam as atividades antiviral (Fischer *et al.*, 2005), e imunomoduladora (Fischer *et al.*, 2007b). A atividade imunomoduladora da própolis verde foi observada pela ação adjuvante em vacinas inativadas (Fischer *et al.*, 2007a; Fischer *et al.*, 2007b). Não há informações a respeito dessa atividade em vacinas compostas de antígenos múltiplos inativados e atenuados.

Esse estudo teve como objetivo avaliar a capacidade imunomoduladora do extrato etanólico de própolis verde para o parvovírus canino (CPV) e o coronavírus canino (CCoV), quando associados com uma vacina composta por antígenos múltiplos. Para tal, foram avaliados parâmetros da resposta humoral e celular de diferentes concentrações dos antígenos em associação ou não com extrato de própolis verde, utilizando-se camundongos como modelo biológico.

2 METODOLOGIA

A própolis verde foi fornecida pela empresa Nectar Farmacêutica Ltda. (Brasil), sendo a matéria seca dissolvida em fosfato (pH 6,2), resultando em um extrato de concentração final de 40 mg/mL.

Para avaliar as propriedades imunomoduladoras do extrato, camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmea, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, foram inoculados com uma vacina comercial contendo sete antígenos vivos atenuados, incluindo o parvovírus canino (CPV), e também o

coronavírus canino (CCoV), inativado e adsorvido ao hidróxido de alumínio, com a co-administração de extrato de própolis. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos de 10 animais. Os grupos 1 e 2 (controles negativos), foram inoculados com solução salina tamponada (PBS) e PBS acrescido de 400 µg/dose de própolis verde, respectivamente. 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 TCID₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares/25 µl), respectivamente. Os animais dos tratamentos 6,7 e 8 receberam as diferentes doses da vacina ($0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 TCID₅₀, respectivamente) acrescidas de 400 µg/dose do extrato etanólico de própolis verde.

Foram realizadas três inoculações por via subcutânea, com intervalo de 30 dias, na região pré-escapular. Vinte e um dias após a terceira inoculação, realizou-se coleta de sangue, através de punção do plexo venoso retro-ocular, com os animais previamente anestesiados (AAALAC, 2003), visando a mensuração dos títulos de anticorpos (IgG), através de um ELISA indireto, de acordo com o método descrito por Voller (1978) e Pratelli *et al.* (2002) para CPV e CCoV, respectivamente, com pequenas adequações. Trinta dias após a terceira inoculação, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados e esplenectomizados, visando o cultivo de esplenócitos para mensuração dos níveis de expressão de mRNA para IFN-γ, por RT-PCR, conforme Ulett *et al.* (2000) como forma de avaliação da resposta imune celular. Os níveis de anticorpos foram comparados usando análise de variância (ANOVA) e, quando houve diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado o teste LSD para determinar diferenças entre as médias de cada tratamento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme esperado, nos animais dos grupos controle negativo (sem antígenos) não houve produção de anticorpos específicos (dados não mostrados). Foi observado um aumento significativo nos níveis de anticorpos para o CPV ($p < 0,05$) no grupo inoculado com a maior concentração de antígenos (3×10^6 TCID₅₀) co-administrados com 400 µg/dose de extrato etanólico, em comparação aos animais que receberam apenas a vacina (Figura 1). Esse resultado sugere ação imunoestimulante da resposta humoral pela própolis verde, sendo este efeito dependente da concentração do CPV. A adição da própolis verde pode ter minimizado uma possível atividade imunossupressora do CPV, quando esse foi usado em maior concentração. Essa hipótese é baseada em algumas pesquisas que apontam o CPV como sendo um agente imunossupressor (Krakowka *et al.*, 1992, Phillips *et al.*, 1989). A estimulação da resposta imune humoral contra o CPV observada nesse estudo soma-se a outros experimentos que atribuíram essa propriedade a própolis, utilizando albumina (Sforzin *et al.*, 2007) ou herpesvírus (Fischer *et al.*, 2007a) como antígeno.

A partir das médias das absorbâncias e o desvio padrão das análises feitas para avaliar os níveis de anticorpos contra o CCoV pôde-se detectar ausência de ação moduladora na resposta humoral específica (dados não mostrados). Estudos anteriores (Fischer *et al.*, 2007a; Fischer *et al.*, 2007b) demonstraram atividade estimulante sobre a resposta imune humoral quando houve co-administração de extratos etanólicos de própolis verde com vacinas inativadas monovalentes. É possível que a forma como foi utilizado o extrato etanólico da própolis verde não tenha permitido a manifestação dessa ação ou, ainda, as diferenças encontradas entre as atividades imunomoduladoras da própolis verde, tanto em relação ao CPV como ao CCoV, possam estar relacionadas ao protocolo de administração

empregado. Contudo, a ausência de atividade estimulante da resposta humoral observada para o CCoV deve estar relacionada às diferentes características antigênicas entre esses vírus. Sabe-se que o sistema imune responde de modo diferenciado conforme o tipo de microorganismo, gerando uma forte resposta humoral, ou celular.

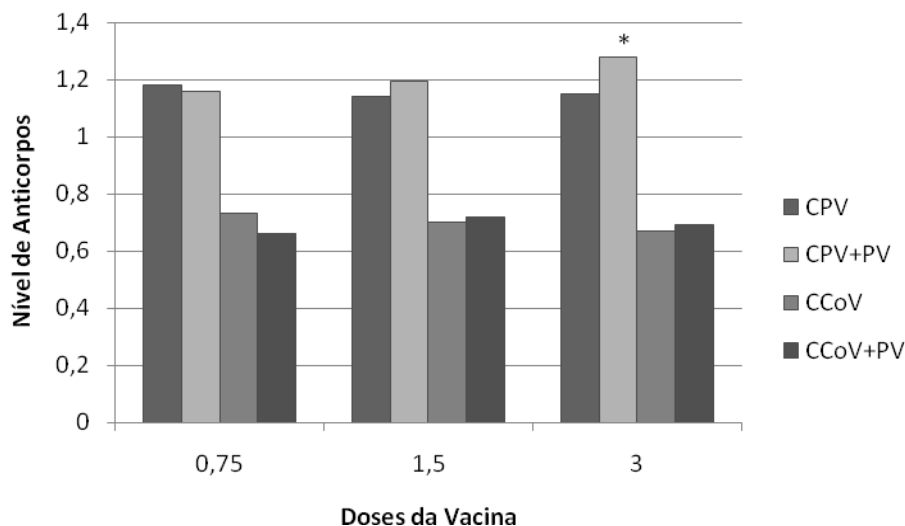


Figura 1 - Média dos níveis de anticorpos contra CPV e CCoV dos soros dos camundongos, na diluição 1:50, determinados por ELISA, 21 dias após a terceira inoculação.

A expressão de mRNA para IFN- γ quarenta e oito horas após estímulo com 0,1 m.o.i. de CPV, teve como resultado uma amplificação inferior nos animais inoculados com antígenos e própolis verde quando comparados com os do tratamento controle. Já nos animais inoculados com CCoV, houve maior síntese de mRNA para IFN- γ quando associou-se extrato etanólico de própolis verde a todas as concentrações dos antígenos, em comparação com aqueles vacinados com as mesmas doses, porém sem própolis. Ou seja, a RT-PCR avaliando mRNA para IFN- γ específico revelou propriedade estimulante da resposta imune celular da própolis verde para CCoV. Os níveis de mRNA para β -actina não variou nos diferentes tratamentos (dados não mostrados), indicando estímulo específico na produção de IFN- γ .

Dentre a diversidade de componentes na própolis verde destacam-se os polifenóis (Castaldo *et al.*, 2002; De Castro, 2001) aos quais são atribuídos atividade de incremento na proliferação de linfócitos (Ivanovska *et al.*, 1995) e capacidade adjuvante (Fischer *et al.*, 2007b). A análise por cromatografia líquida de alta performance da própolis utilizada mostrou que dentro os compostos fenólicos predominaram os derivados de ácido cinâmico, artepilin C e pinobanksin os quais podem estar associados as atividades imunomoduladoras aqui detectadas.

4 CONCLUSÕES

Nesse estudo os resultados obtidos indicam que o extrato etanólico de própolis verde incrementa a resposta humoral contra o CPV e a celular contra o CCoV, evidenciando a sua atividade imunomoduladora. A imunomodulação foi intimamente dependente do tipo e concentração de antígeno utilizado.

5 REFERÊNCIAS

- AAALAC, **Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório**. COBEA, 2003. Disponível em: <<http://www.nap.edu>>. Acessado em: 24 ago. 2007.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis: an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 1, p. S1-S6, 2002.
- CHU, W. H. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 21, p. 113-117, 2006.
- DE CASTRO, S. L. Propolis: Biological and Pharmacological Activities. **Annual Review of Biomedical Sciences**, Cap. 3, p. 49-83, 2001.
- FISCHER, G.; CLEFF, M. B.; DUMMER, L. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VILELA, C. O. et al. Adjuvant effect of green própolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 79-84, 2007a.
- FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; DUMMER, L. A.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O. et al. Immunomodulation produced by green própolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, p. 1250-1256, 2007b.
- FISCHER, G.; DUMMER, L. A.; VIDOR, T.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. In: **Proceedings of the 7th Encontro de pós-graduação**, Pelotas, Brasil, 2005.
- FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75(2), p. 247-253, 2008.
- HELDENS, J. G. M.; PATEL, J. R.; CHANTE, N.; TEN THIJ, G. J.; GRAVENDIJK, M.; SCHIJNS, V. E. J. C. et al. Veterinary vaccine development from an industrial perspective. **The Veterinary Journal**, v. 178, p. 7-20, 2008.
- IVANOVSKA, N.; NEYCHEV, H.; STEFANOVA, Z.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation, cytokine release and *Klebsiella* IFNectin in mice. **Apidologie**, v. 26, p. 73-81, 1995.
- PHILLIPS, T. R.; JENSEN, J. L.; RUBINO, M. J.; YANG, W. C.; SCHULTZ, R. D. Effects of vaccines on the canine immune system. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 154-160, 1989.
- PRATELLI, A.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; PALMIERI, A.; CIRONE, F.; TINELLI, A. et al. Prevalence of canine coronavirus antibodies by na enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. **Journal of Virological Methods**, v. 102, p. 67-71, 2002.
- SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, 301-305, 2005.
- SFORCIN, J. M. Propolis and immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.
- ULETT, G. C.; KETHEESAN, N.; HIRST, R. G. Cytokine gene expression in innately susceptible Balb/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during IFNectin with virulent *Burkholderia pseudomallei*. **Infection and Immunity**, v. 68(4), 2034-2042, 2000.
- VOLLER, A. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). **Ric Clin Lab**, Cap. 8(4), p. 289-298, 1978.