

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS EM VACINA RECOMBINANTE DE SUBUNIDADE CONTRA LINFADENITE CASEOSA

RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES<sup>1</sup>; MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA<sup>2</sup>;  
DÉBORA BRAZ FONTOURA<sup>1</sup>; ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA REZENDE<sup>2</sup>;  
FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA<sup>2</sup>; SIBELE BORSUK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – [raquelneees@gmail.com](mailto:raquelneees@gmail.com), [debora\\_bf@hotmail.com](mailto:debora_bf@hotmail.com)

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – [marathaisos@gmail.com](mailto:marathaisos@gmail.com), [andreaobiomedica@hotmail.com](mailto:andreaobiomedica@hotmail.com), [silvestrebrilhante@gmail.com](mailto:silvestrebrilhante@gmail.com)

<sup>3</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico – [sibeleborsuk@gmail.com](mailto:sibeleborsuk@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite caseosa (LC) ou mal do caroço, é uma doença crônica e infecciosa causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* que acomete caprinos e ovinos (RIBEIRO et al., 2014). Uma vez estabelecida nos rebanhos, a LC possui rápida disseminação, e, aliado a isto, ainda não há uma terapia eficiente para o controle da doença. Assim, a vacinação surge como a principal possibilidade de estratégia para controle e prevenção da LC (GUIMARÃES et al., 2011).

Várias formulações vacinais já foram testadas contra a LC, porém ainda não há uma vacina que seja considerada eficiente e segura para uso nas espécies caprina e ovina (DORELLA et al., 2009). Vacinas recombinantes de subunidade surgem como alternativas mais seguras, no entanto, sua eficiência, na maioria das vezes é dependente de uma associação com adjuvantes adequados para aumentar a sua imunogenicidade e, então prolongar a duração da proteção efetiva (EL SAYED; AHMAD, 2012). Recentemente, a formulação vacinal contendo a serina protease CP40 de *C. pseudotuberculosis* na forma recombinante associada ao adjuvante saponina foi testada, onde foi capaz de induzir um nível de proteção satisfatório (SILVA et al, 2014).

Diversos trabalhos já foram desenvolvidos avaliando o potencial adjuvante de produtos naturais, dentre eles podemos citar o uso da própolis (SFORCIN, 2007; SFORCIN; BANKOVA, 2011). Alguns trabalhos avaliando o potencial imunológico das própolis verde e marrom já foram conduzidos, e, em geral essas vacinas elicitam elevados níveis de respostas imunes humoral e celular (FISCHER et al., 2010; EL SAYED; AHMAD, 2012). Entretanto, não há ainda relatos do uso da própolis vermelha como adjuvante vacinal.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial imunoprotetor da vacina composta pela proteína recombinante rCP40 e pelo óleo essencial de própolis vermelha (OEP), e ainda caracterizar a resposta imune humoral induzida.

### 2. METODOLOGIA

As amostras da própolis vermelha brasiliense foram coletadas no município de Brejo Grande, SE, (S 10°28'25" e W 36°26'12"). Para a extração do óleo essencial de própolis vermelha (OEP), utilizou-se o método de hidrodestilação. Para uso como adjuvante, o OEP foi reconstituído em óleo de canola na proporção de 1:1. Já a proteína recombinante rCP40 foi expressa na cepa DE3 BL21 Star *Escherichia coli* de acordo com o protocolo de SILVA et al. (2014).

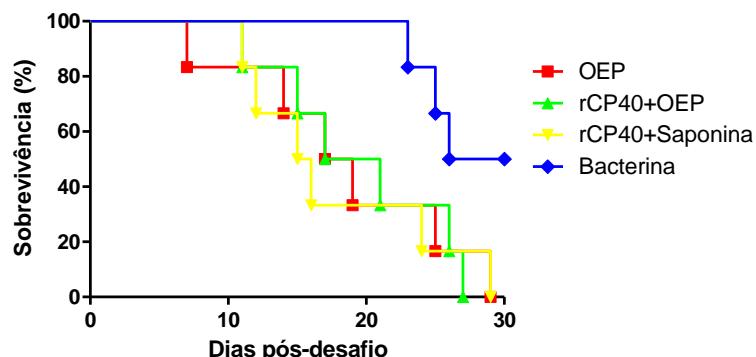
Para os experimentos de imunização e desafio foi utilizado um total de 24 camundongos Balb/c, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, divididos em 4 grupos de 6 animais. A condução do experimento foi aprovada pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel nº 2422). Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: G1, como controle negativo, inoculado com 20  $\mu$ L do adjuvante OEP, em uma dose final de 200  $\mu$ L, via i.m.; G2, como grupo experimental, inoculado com 20  $\mu$ L de OEP associado a 50  $\mu$ g de rCP40, em dose final de 200  $\mu$ L, via i.m; G3, como controle positivo, inoculado com 50  $\mu$ g de rCP40 associada a saponina (7,5  $\mu$ g), em dose final de 300  $\mu$ L, via s.c.; G4, como controle positivo, inoculado com 100  $\mu$ L de bacterina, via i.p., produzida a partir da inativação do cultivo contendo  $10^6$  UFC da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram imunizados com 2 doses da vacina com intervalo de 21 dias. O desafio foi realizado 21 dias após a última imunização com 1 mL contendo  $10^5$  UFC da cepa MIC-6 por via i.p. Após a realização do desafio, os animais foram acompanhados durante 30 dias.

As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Ensaios de ELISA indireto para mensuração dos níveis de IgG total e também dos isótipos IgG1 e IgG2a foram realizados conforme descrito por SILVA *et al.* (2014).

As análises estatísticas dos ensaios de ELISA foram feitas usando o software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, USA). Diferenças entre a produção de IgG nos diferentes grupos foram calculadas pelo one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ . Para determinar diferenças significativas na mortalidade e taxa de sobrevivência entre os grupos experimentais, foram usados o teste exato de Fisher e o teste log-rank, respectivamente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

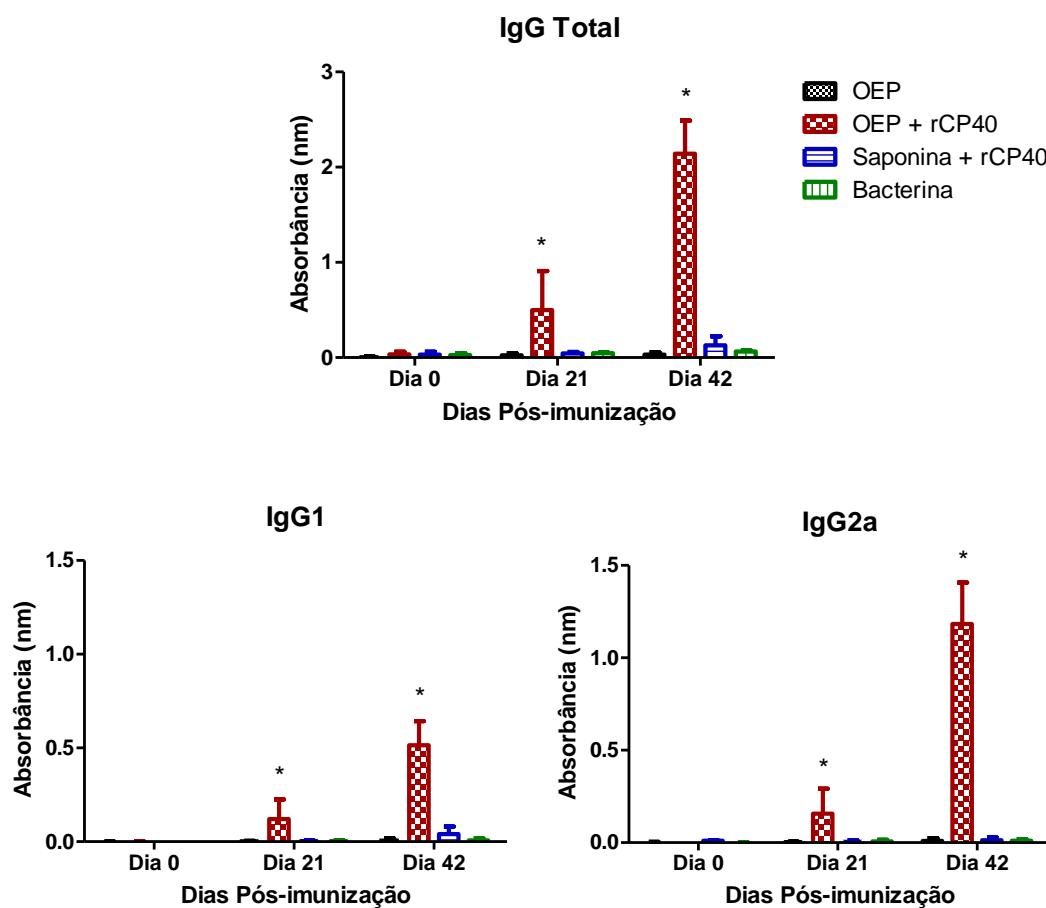
Após 30 dias da realização do desafio, todos os animais dos grupos G1, G2 e G3 haviam morrido (Figura 1). Apenas 3 animais (50%) do grupo do controle positivo Bacterina permaneceram vivos no 30º dia. Esses resultados podem ser explicados, uma vez que a dose desafio utilizada no presente experimento foi de  $10^5$  UFC da cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. Silva et al., (2014) obtiveram uma taxa de proteção de 90% utilizando a mesma combinação de rCP40 e saponina que foi utilizada para imunizar o G3, entretanto, o desafio foi realizado com uma dose de  $10^4$  de MIC-6.



**Figura 1.** Curva de sobrevivência demonstrando os níveis de proteção imunológica do óleo essencial de própolis vermelha associado à proteína recombinante rCP40

de *C. pseudotuberculosis* após o desafio com a cepa MIC-6 (OEP = óleo essencial de própolis vermelha brasileira).

Apesar dos baixos índices de proteção, observou-se que a combinação do óleo essencial de própolis (OEP) à proteína rCP40 foi capaz de induzir níveis significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) de IgG, IgG1 e IgG2a em relação aos demais grupos do experimento. Além disso, os níveis de IgG2a foram aproximadamente duas vezes maiores que os níveis de IgG1, o que pode indicar uma polarização da resposta imune para o fenótipo Th1. Em camundongos, as células T CD4+ auxiliares podem induzir a produção de anticorpos da classe IgG2a que é capaz de favorecer direta ou indiretamente uma resposta do tipo Th1, que confere imunidade a patógenos intracelulares (Alberts et al., 2007).



**Figura 2.** Avaliação dos níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) específicas em camundongos imunizados com rCP40 associada ao óleo essencial de própolis vermelha brasileira (OEP). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (barras) das absorbâncias (nm) encontradas no ensaio de ELISA indireto para cada grupo experimental. O sangue foi coletado e avaliado nos dias 0, 21 e 42 do experimento. \*Resultado significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles e aos demais grupos experimentais.

#### 4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de própolis vermelha brasileira apresenta grande potencial na indução de IgG, especialmente IgG2a, indicando um perfil imunomodulatório do tipo Th1. Entretanto, a formulação vacinal contendo OEP não foi capaz de induzir

proteção. Estudos adicionais utilizando novos抗ígenos de *C. pseudotuberculosis*, bem como de outros patógenos devem ser realizados visando aumentar o nível de proteção das formulações vacinais contendo o OEP.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P; **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2007.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R.W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v.8, n.2, p.215-2013, 2009.

EL SAYED, H.; AHMAD, T.A. The use of propolis as adjuvant. **Vaccine**. v.31, n.1, p.31-39, 2012.

FISCHER, G.; PAULINO, N.; MARCUCCI, M.C.; SIEDLER, B.S.; MUNHOZ, L.S.; FINGER, P.F.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S.O.; VIDOR, T.; ROEHE, P.M. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.7, 908-913, 2010.

GUIMARÃES, A.S.; CARMO, F.B.; PAULETTI, R.B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A.M.G. Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. **The II OAB Journal**, v.2, n.2, p.33-43, 2011.

SILVA, J. W.; DROPPA-ALMEIDA, D.; BORSUK, S.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R.W.; MIYOSHI, A.; ROCHA, F.S.; DORELLA, F.A.; VIVAS, W.L.; PADILHA, F. F.; HERNÁNDEZ-MACEDO, M.L.; LIMA-VERDE, I.B. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.965, 2014.

RIBEIRO, D.; ROCHA, F.D.S.; LEITE, K.M.C.; SOARES, S.D.C.; SILVA, A.; PORTELA, R.W.D.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S.C.; AZEVEDO, V.; DORELLA, F.A. (2014). An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary research**, n.45, v.1, p. 28, 2014.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v.113, n.1, p.1-14, 2007.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.253-260, 2011.