

RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE ANIMAIS IMUNIZADOS COM VACINA CONTENDO MELITINA ISOLADA DE VENENO DE ABELHA

RENATA NOBRE DA FONSECA¹; TONY PICOLI²; ALESSANDRA GOULART TEIXEIRA²; CRISTINA PETER²; MATEHUS GOMES LOPES²; GEFERSON FISCHER³

¹*Universidade Federal de Pelotas – renatanobredafonseca@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – picolivet@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A melitina é um peptídeo que está presente no veneno de abelhas melíferas (DEMPSEY, 1990) e corresponde a aproximadamente 50% do seu peso seco (CRUZ-LANDIM, 2002). Melitina apresenta atividades farmacológicas e antimicrobianas conhecidas (OREN, 1997), porém com relato de toxicidade por se ligar a membranas lipídicas elevando a permeabilidade com consequente rompimento (SUBBALAKSHMI, 1999), além de aumentar os níveis de estresse oxidativo (HAN, 2002). Seus efeitos sobre a resposta imune ainda não estão totalmente elucidados, uma vez que há uma escassez de estudos com relação à sua atividade sobre o sistema imunológico. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade imunomoduladora sobre a resposta imune adquirida de animais inoculados com vacinas oleosas e inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) acrescidas de melitina.

2. METODOLOGIA

Para confecção das vacinas contra herpesvírus bovino tipo 1, o vírus com título de $10^{7.5}$ CCID50/25 foi diluído 1:100 e então foi inativado com 1% de bromoetilenamina (2M) sob agitação a temperatura ambiente por 12 horas. A vacina foi confeccionada a partir da emulsificação da suspensão viral (50%) com o adjuvante oleoso (50%). Para realização do estudo foram adicionadas à vacina diferentes doses de melitina: 0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mg/kg e após foi feita a emulsificação.

Os animais utilizados para realização do estudo foram camundongos fêmeas da linhagem BALB/C com 10 semanas de vida e massa corpórea média de 26 gramas. Esses animais foram divididos em seis grupos de 10 animais cada: grupo controle negativo (PBS), controle positivo (vacina sem melitina), grupo 1 (vacina + melitina 0,25 mg/kg), grupo 2 (vacina + melitina 0,5 mg/kg), grupo 3 (vacina + melitina 1 mg/kg) e grupo 4 (vacina + melitina 1,5 mg/kg). Os animais foram imunizados com 0,2 mL da respectiva vacina por via intramuscular em duas aplicações com intervalo de 21 dias entre elas (dias 0 e 21). As coletas de sangue foram realizadas pelo plexo venoso retro-orbital nos dias 0 (dia da primeira vacinação), 21, 42 e 63, configurando a primeira, segunda, terceira e quarta coletas, respectivamente. O sangue coletado foi centrifugado (1500rpm) por 10 minutos e o soro obtido foi congelado a temperatura de -20°C até o uso.

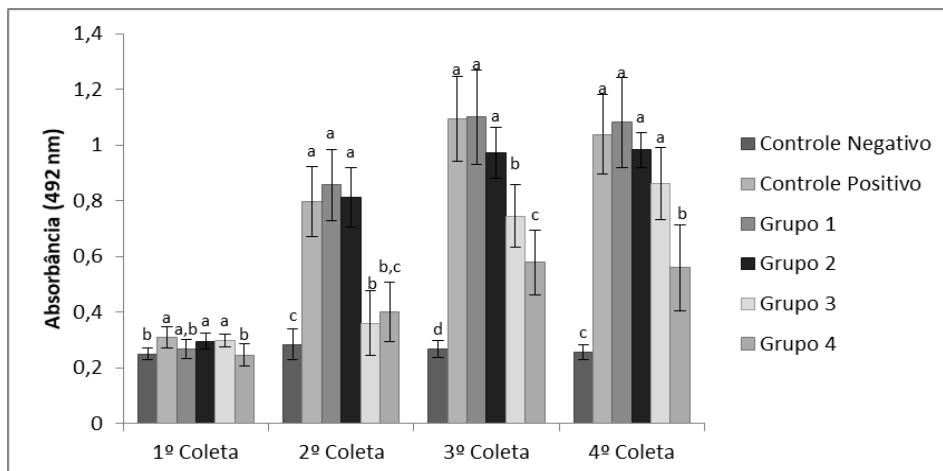
O método de análise utilizado foi o ensaio imuno-enzimático (ELISA indireto), conforme descrito por LEITNER et al. (2011), com algumas alterações. Para realização do teste foram utilizadas placas de 96 cavidades (COSTAR-USA)

que foram previamente sensibilizadas com 100 μ L de suspensão viral (BoHV-1) durante 2 horas a temperatura de 37°C. Após, as placas foram lavadas três vezes com solução de PBS-T (tampão fosfato salino acrescido de Tween 20) e imediatamente submetidas ao bloqueio, adicionado 100 μ L de solução de leite em pó a 5% por cavidade durante 30 minutos a 37°C. Novamente foi realizada a lavagem das placas com PBS-T e então foram adicionados os soros dos camundongos (100 μ L por poço), na diluição de 1:40 para pesquisa de IgG. As placas foram incubadas por 90 minutos a 37°C. Após três lavagens com PBS-T foi adicionado anticorpo conjugado anti-camundongo (SIGMA-USA), diluído a 1:10000. As placas foram novamente incubadas por 60 minutos a 37°C. Finalmente as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e então receberam a substância de revelação OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride - 195 SIGMA - USA), sendo mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos sob abrigo da luz. A reação foi interrompida com a utilização de 50 μ L por cavidade de solução de ácido sulfúrico 2M. A leitura de absorbância foi realizada em leitor de microplacas TP-Reader (Thermoplate) utilizando comprimento de onda de 492nm. Os testes foram realizados em triplicata.

A análise estatística foi realizada através de análise de variância com comparação entre médias pelo teste de Tukey, adotando uma significância de 95% do software Bio Estat versão 5.3. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal, processo número 23110.007393/2014-44.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar na figura 1 que as duas maiores concentrações de melitina (1 e 1,5 mg/kg) diferiram do controle positivo ($p<0,05$), produzindo menores títulos de anticorpos. As duas menores concentrações (0,25 e 0,5 mg/kg), em todas as coletas, não diferenciaram estatisticamente do controle positivo. Dessa maneira conforme a concentração de melitina aumentou, houve uma diminuição na produção de anticorpos.



Controle negativo (PBS), controle positivo (vacina sem melitina), grupo 1 (vacina+0,25 mg/kg de melitina), grupo 2 (vacina+0,5 mg/kg de melitina) + grupo 3 (vacina + 1 mg/kg de melitina) + grupo 4 (vacina + 1,5 mg/kg de melitina). Letras diferentes em análises de uma mesma coleta indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Figura 1 – Produção de IgG em camundongos inoculados com vacinas experimentais contra BoHV-1 contendo melitina. Análise através de ELISA indireto.

Segundo DEZFULI et al. (2014) a administração de melitina como adjuvante à vacina contra o vírus da hepatite B nas concentrações 2,5 μ g, 5 μ g e 10 μ g por dose não influenciou a resposta imune celular ou humoral, já que não houve diferença do controle positivo ($p>0,715$). Em concentrações semelhantes, em nosso estudo também não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos 1 (0,25 mg/kg, quando foi aplicado 6,5 μ g de melitina por dose) e grupo 2 (0,5 mg/kg, aplicado 13 μ g de melitina por dose) com o controle positivo (vacina sem melitina).

KING et al. (1998) constataram que camundongos que foram expostos a frações da molécula de melitina (10-30 μ L intranasal e 50-150 μ L subcutânea) e após à molécula inteira, obtiveram redução tanto da resposta imune celular como humoral. No presente trabalho também foi verificado que em doses a partir de 26 μ g de melitina (grupo 3), houve supressão da produção de IgG diferindo do controle positivo ($p<0,05$). Porém, após 42 dias da última vacinação apenas os animais do grupo 4, que receberam vacinas contendo 39 μ g de melitina, continuaram com supressão dos títulos de IgG ($p<0,05$). Na última coleta, os animais do grupo 3 igualaram-se ao controle positivo e aos animais dos grupos 1 e 2 ($p>0,05$).

Contudo, BRAMWELL et al. (2003) demonstrou que 4 μ g de melitina utilizada como adjuvante em uma vacina intranasal contra tétano e difteria proporcionou um aumento no número de anticorpos e na longevidade da resposta imune, quando comparado ao controle positivo. Esses resultados diferem dos encontrados nesse estudo, uma vez que não foi observado elevação dos títulos de anticorpos além dos encontrados no controle positivo, em função do acréscimo de melitina à vacina.

Com base nos resultados obtidos foi possível observar que a melitina agiu como fator imunossupressor nos animais que receberam doses acima de 1mg/kg, dessa maneira o uso da melitina poderia auxiliar em tratamentos contra doenças auto-imunes, por exemplo, nas quais é necessário que haja um controle da atividade imunológica que, nesses casos, é indesejável.

4. CONCLUSÕES

A melitina em concentrações a partir de 1mg/kg, quando adicionada a uma vacina oleosa e inativada, deprimiu a produção de IgG, porém 42 dias após a última vacinação, apenas a vacina contendo 1,5 mg/kg de melitina apresentou menores títulos de IgG.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAMWELL, V.W.; SOMAVARAPU, S.; OUTSCHOORN, I.; ALPAR, H.O. Adjuvant Action of Melittin Following Intranasal Immunisation with Tetanus and Diphtheria Toxoids. *Journal of drug targeting*, Reino Unido, v. 11, n. 8-10, p. 525-530, 2003.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.

DEMPSEY, C.E. The action of melittin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Reviews on Biomembranes*, Amsterdam, v. 1031, n. 2, p. 143-161, 1990.

DEZFULI, H.T.; SHAHBAZZADEH, D.; EIDI, A.; BAGHERI, K.P.; PAKRAVAN, N.; AMINI, S.; AGHASADEGHI, M.R.; MAHDAVI, M. Induction of IFN- γ cytokine response against hepatitis B surface antigen using melittin. **Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench**, Tehran, v. 7, n. 2, p. 108-117, 2014.

HAN, H.J.; PARK, S.H.; LEE, J.H.; YOON, B.C.; PARK, K.M.; MAR, W.C.; LEE, H.J.; KANG, S.K. Involvement Of Oxidative Stress In Bee Venom-Induced Inhibition Of Na⁺/Glucose Cotransporter In Renal Proximal Tubule Cells. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 29, n. 7, p. 564-568, 2002.

KING, T.P.; LU, G.; AGOSTO, H. Antibody responses to bee melittin (Api m 4) and hornet antigen 5 (Dol m 5) in mice treated with the dominant T-cell epitope peptides. **Journal of allergy and clinical immunology**, Amsterdam, v. 101, n. 3, p. 397-403, 1998.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; KIRAN, M.D.; BALABAN, N. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. **Veterinary immunology and Immunopathology**, v. 142, n. 1, p. 25-35, 2011.

OREN, Z.; SHAI, Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin:structure–function study. **Biochemistry** v. 36, n. 7, p. 1826-1835, 1997.

SUBBALAKSHMI, C.; NAGARAJ, R.; SITARAM, N. Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. **FEBS letters**, v. 448, n. 1, p. 62-66, 1999.