

## AVALIAÇÃO DE UMA VACINA DE MUCOSA, DE APLICAÇÃO INTRAVAGINAL, CONTRA O ALPHAHERPESVIRUS BOVINO TIPO 5 ASSOCIADO AO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS MARROM

NADÁLIN YANDRA BOTTON<sup>1</sup>; CRISTINA MENDES PETER<sup>2</sup>; LARIANE DA SILVA BARCELOS<sup>2</sup>; MATHEUS IURI FRÜHAUF<sup>2</sup>; GEFERSON FISCHER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nadalinyb@gmail.com](mailto:nadalinyb@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [cristina\\_peter@hotmail.com](mailto:cristina_peter@hotmail.com), [larianebarcelos@gmail.com](mailto:larianebarcelos@gmail.com), [matheus.fruhauf@outlook.com](mailto:matheus.fruhauf@outlook.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [geferson.fischer@gmail.com](mailto:geferson.fischer@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Os alphaherpesvirus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) pertencem à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e caracterizam-se como importantes patógenos que afetam os sistemas respiratório e reprodutivo de bovinos, além de serem responsáveis, especialmente o BoHV-5, por casos de meningoencefalite (FLORES et al., 2017; OKAMURA, 2017). Utilizam como porta de entrada no organismo as cavidades revestidas por células epiteliais de mucosa, onde há replicação inicial, seguida de disseminação local, viremia sistêmica e disseminação neuronal (OKAMURA, 2017). Além disso, possuem a capacidade de estabelecer latência no hospedeiro, com períodos de reativação e excreção, o que faz com que os surtos sejam imprevisíveis, especialmente em áreas endêmicas (ALFIERI; ALFIERI, 2017).

Apesar do crescente desenvolvimento em tecnologias vacinais nos últimos anos, este vírus continua sendo uma das principais causas de perdas econômicas na bovinocultura (ALMEIDA et al., 2016). As imunizações parentais não resultam em uma resposta imune apropriada de mucosa (FERREIRA et al., 2017), que poderia prevenir a fixação dos BoHV. A indução de Imunoglobulina A secretora (IgAs), nas superfícies mucosas, efetiva em conferir proteção contra infecções, depende do imunógeno, da rota de imunização e do adjuvante utilizado (DEHGHAN et al., 2014), portanto, a identificação de substâncias adjuvantes que potencializem a ação de vacinas pouco imunogênicas, como as inativadas por exemplo, ou que promovam imunidade de mucosa, pode ser altamente proveitosa para o controle das enfermidades e consequentemente dos prejuízos causados pelos BoHV.

Estas características foram observadas em estudos realizados com a própolis, uma substância resinosa natural, quimicamente complexa, colhida por abelhas melíferas em diferentes partes das plantas. A própolis possui propriedades bioativas como ação antiviral, anti-inflamatória, antibacteriana, anticarcinogênica, antioxidante, antiparasitária (AMINIMOUGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI, 2017), além de relatos vinculados a ações imunoestimulante e imunomoduladora (BATISTA, 2015).

Desta maneira, objetivamos investigar a capacidade imunomoduladora do extrato aquoso da própolis marrom quando utilizado como adjuvante em uma vacina inativada de aplicação intravaginal contra o BoHV-5.

### 2. METODOLOGIA

Uma cepa de BoHV-5 (cepa EVI 88/95 – isolada de terneiros com sinais clínicos de encefalite no Estado do Mato Grosso do Sul) foi amplificada e titulada

em células *Madin Darby Bovine Kidney* – MDBK, utilizando-se um título viral de  $10^7$  DICC<sub>50</sub>/mL para as vacinas experimentais.

As amostras da própolis marrom foram adquiridas comercialmente da Cooperativa de Apicultores e Fruticultores da Região Sul, localizada no Município de Pelotas, RS. O extrato aquoso de própolis foi preparado na porção de 1 parte de própolis para 3 partes de água deionizada sob agitação, sendo a mistura incubada por 2 horas a 95°C. Após a extração, a mistura foi centrifugada a 8.000 rpm durante 10 minutos a 20°C, e os sobrenadantes obtidos foram armazenados em tubos falcon, em refrigerador.

Os óvulos vaginais foram preparados a partir de gelatina farmacêutica (Tabela 1). Resumidamente, a gelatina farmacêutica foi fundida a 90° C e, após resfriada à temperatura de 37° C, foram incorporados o antígeno e o extrato de própolis marrom. Após resfriamento, os óvulos foram acondicionados em embalagem de papel alumínio e mantidos a 4° C até o momento da aplicação.

Para verificação da eficácia da vacina, 10 fêmeas bovinas com 3 a 4 meses de idade, sorologicamente negativas para BoHV-5 pela técnica de soroneutralização e ao vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) pelo Teste de ELISA, foram categorizadas de forma aleatória utilizando o peso de cada animal. Dessa forma, os bovinos foram divididos em dois grupos de 5 animais e inoculados por via intravaginal, com duas doses de vacina, em intervalo de 30 dias, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais para avaliação da eficácia da vacina em bovinos

Tratamento	Componente Vacinal	Nº de animais
Grupo 1	Gelatina farmacêutica + BoHV-5 + Extrato aquoso de própolis marrom	5
Grupo 2	Gelatina farmacêutica + Extrato aquoso de própolis	5

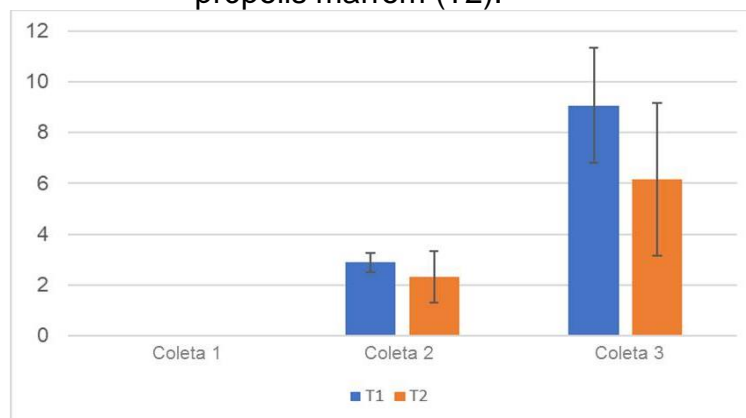
A coleta de material biológico foi realizada nos dias 0, 30 e 60 após a primeira vacinação. Foram coletadas amostras de sangue em tubos sem coagulante. No Laboratório de Virologia e Imunologia (LabVir) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), procedeu-se a centrifugação das amostras (3000 rpm, 15 minutos) para separação e coleta do soro sanguíneo, que posteriormente foi submetido à temperatura de 56°C por 30 minutos para inativação do sistema complemento. Para avaliação da resposta imune conferida pela vacina realizou-se a técnica da soroneutralização. Resumidamente, as amostras foram diluídas seriadamente de 1:2 a 1:256 e distribuídas (25 µl) em quadruplicata em microplacas de poliestireno (Kasvi®) para posterior adição de 100 TCID<sub>50</sub> do BoHV-5. Após uma hora de incubação a 37° C em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub>,  $3 \times 10^4$  células da linhagem MDBK foram adicionadas, e as microplacas foram incubadas sob as mesmas condições até o momento da manifestação das 100 TCID<sub>50</sub> (72 horas). O título de anticorpos neutralizantes foi calculado pelo método Behrendts e Kärber (MAYR et al., 1982).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, pode-se observar que a utilização de uma vacina inativada contra o BoHV-5, em associação com o extrato aquoso da própolis marrom, induziu títulos de anticorpos neutralizantes aos 30 e 60 dias após a primeira inoculação. Entretanto, no tratamento controle, sem a adição do antígeno BoHV-

5, observou-se também a soroconversão, possivelmente sendo explicada pela ocorrência de infecção do BoHV-1 ou BoHV-5, nos animais experimentais, durante o período do estudo.

Figura 1. Títulos de anticorpos neutralizantes ( $\text{Log}_{10}$ ) de animais inoculados com óvulos intravaginais contendo gelatina farmacêutica, BoHV-5 e extrato aquoso de própolis marrom (T1) ou gelatina farmacêutica e extrato aquoso de própolis marrom (T2).



FISCHER et al. (2007), avaliando a capacidade adjuvante do extrato etanólico da própolis verde brasileira, associado ao Herpesvírus Suíno Tipo 1 (SuHV-1) inativado, inoculado via parenteral em camundongos, constatou que o extrato etanólico da própolis verde, em associação com o hidróxido de alumínio gerou uma resposta imune humoral mais potente, quando comparada à resposta estabelecida nos animais do grupo tratamento sem associação do extrato de própolis, corroborando com SFORCIN; ORSI; BANKOVA (2005) que demonstraram a atividade adjuvante da própolis através da sua capacidade de modulação da síntese de anticorpos.

O estímulo da resposta imune no local de ingresso do patógeno no organismo é essencial (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006). No caso do BoHV-5, a imunidade humoral local, mediada principalmente por IgA secretora (IgsA), tem fundamental importância na defesa das mucosas, pois confere proteção a estas superfícies através de distintos mecanismos, como a neutralização viral (DEHGHAN et al., 2014). O desenvolvimento de vacinas que estimulem a resposta imunológica no sistema integrado de mucosas torna-se, desta forma, elementar para o controle destes agentes etiológicos nos rebanhos bovinos.

#### 4. CONCLUSÕES

A inoculação de uma vacina inativada contra o BoHV-5, por via intravaginal, associada ao extrato aquoso de própolis marrom, demonstrou-se uma boa alternativa, já que houve soroconversão. No entanto, a provável infecção dos animais experimentais com vírus de campo, inviabiliza uma análise mais aprofundada.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFIERI, A. A.; ALFIERI A. F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 133-139, 2017.

ALMEIDA, I. C.; SENA, L. M.; SARMENTO, L. P.; BARIONI, G.; OLIVEIRA, F. A. Aspectos relacionados à brucelose, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina e sua relação com a qualidade do leite. In: VIANNA, U. R. et al. **Tópicos Especiais em Ciência Animal V**. Espírito Santo: CAUFES, 2016. Cap. 4, p. 51-64.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A. Propolis diterpenes as a remarkable bio-source for drug discovery development: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1290-1304, 2017.

BATISTA, E. K. F. et al. Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 413-419, 2015.

DEHGHAN, S. et al. Rabbit nasal immunization against influenza by dry-powder form of chitosan nanospheres encapsulated with influenza whole virus and adjuvants. **International journal of pharmaceutics**, v. 475, n. 1-2, p. 1-8, 2014.

FERREIRA, R. C.; NEVES, H. F. M.; PINTO, J. F.; LOPES, C. M. Overview on Inhalable Nanocarriers for Respiratory Immunization. *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, n. 00, p. 1-22, 2017.

FISCHER, G. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250-1256, 2007.

FLORES, E. F. et al. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2017.

MAYR, A.; BACHMANN, P. A.; BIBRACK, B. M.; WITHMANN, G. Virologische Arbeitsmethoden: Band IV- Sicherheit bei virologischen arbeiten. **Biometrische methoden**, 1982.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nature Publishing Group**, v.65, p. 148-158, 2006.

ODA, J. M. M. et al. Ação do extrato de própolis na Leishmaniose. **Semina. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 111-121, 2011.

OKAMURA, L.H. **Interação célula hospedeira e a infecção pelo herpesvírus bovino 5 (BHV5)**. 2017. 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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, n. 3, p. 301-305, 2005.