

## POTENCIAL ADJUVANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PROPÓLIS VERDE EM VACINA INATIVADA CONTRA O *ALPHAHERPESVIRUS BOVINO 5* (BoHV-5)

LUIZA RIBEIRO DA ROSA<sup>1</sup>; NADÁLIN YANDRA BOTTON<sup>2</sup>; MATHEUS IURI FRÜHAUF<sup>2</sup>; LARIANE DA SILVA BARCELOS<sup>2</sup>; MARINA STURBELLE GARCIA<sup>2</sup> E GEFERSON FISCHER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – luizaribeirovet@outlook.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – nadalinyb@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – matheus.fruhauf@outlook.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – sturbellemarina@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O *Alphaherpesvirus bovino 5* (BoHV-5) é um membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2015). É transmitido pelo contato direto entre animais infectados, e após a infecção inicial, estabelece infecção latente nos gânglios nervosos sensoriais, fazendo do animal, portador pelo resto de sua vida, e permitindo que o vírus seja reativado durante períodos de estresse ou imunossupressão (HENZEL, et al., 2019). O BoHV-5 está associado a casos de doença neurológica, conhecida como Meningoencefalite Herpética Bovina, que afeta o sistema nervoso central de bovinos (ZAJAC et al., 2010). Essa enfermidade traz implicações econômicas para a pecuária nacional devido ao impacto que causa na saúde animal e pelos índices de mortalidade, que podem chegar a 100% (NEWCOMER; WALZ; GIVENS, 2014).

As vacinas inativadas são o método de prevenção mais utilizado para controlar a disseminação do vírus e prevenir a doença associada a ele, sendo mais seguras pelo fato do agente não ter potencial replicativo e não possuir capacidade de reverter à forma virulenta (SILVA, et al., 2007). Entretanto, essas vacinas necessitam de adjuvantes, substâncias capazes de estimular uma resposta imune adequada, prolongar a duração da proteção e minimizar reações adversas, para potencializarem sua ação (SPICKLER; ROTH, 2003).

A própolis é uma substância resinosa natural coletada pelas abelhas, oriunda de várias fontes vegetais e transformada por meio da adição de cera, pólen e produtos do próprio metabolismo desses insetos em uma substância com propriedades bioativas que possui ação antiviral e imunomoduladora (FISCHER et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi testar a ação adjuvante de um extrato de própolis verde brasileira em uma vacina inativada, utilizando como modelo antigênico o *Alphaherpesvirus bovino 5* (BoHV-5) e animais da espécie ovina como modelo experimental.

### 2. METODOLOGIA

No experimento foram utilizados 30 ovinos sorologicamente negativos para BoHV-5 e BVDV (Vírus da Diarreia Viral Bovina), oriundos do Centro Agropecuário da Palma, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (Tabela 1).

**Tabela 1. Grupos e composições vacinais para a avaliação do potencial adjuvante de um extrato hidroalcoólico de própolis verde em uma vacina inativada**

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Composição</b>	<b>Nº de animais</b>
Controle positivo	Antígeno + hidróxido de alumínio + meio essencial mínimo	6
Controle negativo	PBS	6
Tratamento 1	Antígeno + extrato hidroalcoólico de própolis 60 mg/mL + meio essencial mínimo	6
Tratamento 2	Antígeno + extrato hidroalcoólico de própolis 60 mg/mL + hidróxido de alumínio	6
Tratamento 3	Antígeno + extrato hidroalcoólico de própolis 30 mg/mL + hidróxido de alumínio	6

A cepa R.P. de BoHV-5, pertencente ao Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) da UFPEl, foi utilizada como antígeno nas vacinas. O antígeno foi produzido segundo metodologia conhecida (FISCHER et al., 2010) e a suspensão viral foi inativada de acordo com protocolo descrito por Silva et al. (2004). Utilizou-se um título de  $10^7$  DICC<sub>50</sub>/mL para a produção das vacinas.

O hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) 4,3% foi utilizado como adjuvante padrão no experimento. O extrato hidroalcoólico de própolis foi produzido no Laboratório de Processos de Separação do IFRS-Campus Sertão, Sertão-RS, seguindo o protocolo de extração proposto por Picoli et al. (2016), a partir de uma amostra de própolis verde brasileira bruta, cedida gentilmente pela empresa MN Própolis, Mogi das Cruzes-SP.

Após o preparo das vacinas os animais foram inoculados em três doses vacinais, pela via intramuscular, com intervalo de 21 dias (dias 0, 21 e 42), e coletas de sangue foram realizadas em tubos com ativador de coágulo Firstlab® nos dias 0 e 63 após a primeira vacinação.

O sangue coletado dos animais em experimento foi enviado ao Labvir e processado através de centrifugação a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos para a separação e coleta do soro sanguíneo. Posteriormente os soros foram submetidos ao teste de soroneutralização (FISCHER et al., 2007) para determinar o título de anticorpos neutralizantes compreendido nas amostras.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização da técnica de soroneutralização, avaliou-se os títulos de anticorpos neutralizantes em diferentes grupos de animais para compreender os efeitos de tratamentos específicos. Inicialmente, estabeleceu-se um grupo de controle positivo, composto por seis animais, em que três deles demonstraram um título de anticorpos neutralizantes 2. Em contrapartida, o grupo controle negativo (PBS), consistiu em seis animais que não apresentaram nenhum título detectável de anticorpos neutralizantes. Através desses dois primeiros grupos foi possível estabelecer uma referência inicial para a presença ou ausência desses anticorpos.

Em relação aos tratamentos, implementou-se três abordagens diferentes: no Tratamento 1, que o extrato hidroalcoólico de própolis verde foi associado ao antígeno sem hidróxido de alumínio, não foi observado nenhum título significativo de anticorpos neutralizantes (Figura 1). Isso sugere que o tratamento em questão não teve efeito na produção desses anticorpos. Já no Tratamento 2, em que o antígeno foi associado a 60mg/mL de extrato hidroalcoólico de própolis verde e ao

hidróxido de alumínio, notou-se um aumento no título de anticorpos neutralizantes, com dois animais atingindo um título 4 e três animais com título 2 (Figura 1). Isso indica que esta abordagem teve efeito positivo na produção de anticorpos neutralizantes. Por fim, no Tratamento 3 (antígeno + extrato hidroalcoólico de própolis 30 mg/mL + hidróxido de alumínio), observou-se um resultado intermediário, com um animal alcançando um título 4 e dois animais com título 2 (Figura 1). Isso sugere que esta abordagem também influenciou positivamente a produção de anticorpos neutralizantes, embora em menor grau em comparação com o Tratamento 2.

Essa variação nos resultados pode ser atribuída à diferença na quantidade de extrato hidroalcoólico aplicada nos grupos 2 e 3. A concentração de 60 mg/mL (Tratamento 2) mostrou-se ter sido mais eficaz na estimulação de produção de anticorpos e conseqüentemente possuir maior potencial adjuvante, em relação a concentração de 30 mg/mL (Tratamento 3).

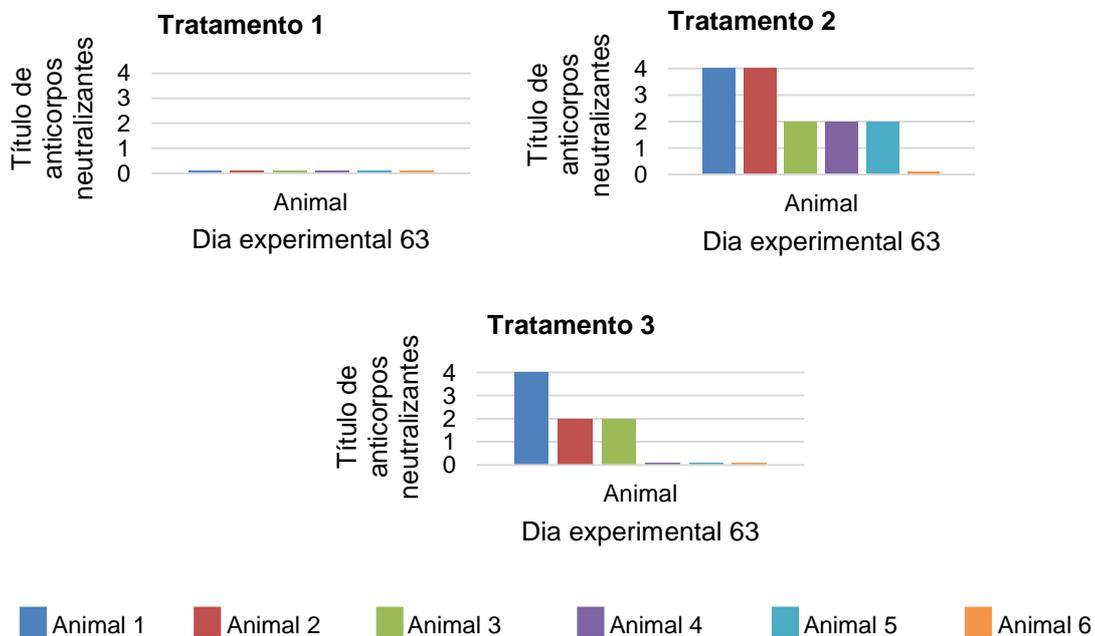


Figura 1. Título de anticorpos neutralizantes induzidos por vacinação contra o BoHV-5 no dia 63 após a primeira vacinação. Tratamento 1 (antígeno + extrato hidroalcoólico de própolis 60 mg/mL + meio essencial mínimo); Tratamento 2 – (antígeno + extrato hidroalcoólico de própolis 60 mg/mL + hidróxido de alumínio); Tratamento 3 – (antígeno + extrato hidroalcoólico de própolis 30 mg/mL + hidróxido de alumínio).

Observou-se, portanto, que a combinação do extrato hidroalcoólico de própolis verde, em concentrações de 30 ou 60 mg/mL, associado ao hidróxido e alumínio e ao antígeno, foi capaz de induzir níveis de anticorpos notavelmente maiores em comparação aos demais grupos do experimento, em que não se utilizou o extrato. Os dados indicam que a própolis possui potencial adjuvante, levando a uma imunestimulação e maior produção de anticorpos contra o *Alphaherpesvirus bovino 5* (BoHv-5).

### 3. CONCLUSÕES

A concentração de 60 mg/mL de extrato hidroalcoólico de própolis verde, associada ao hidróxido de alumínio, demonstrou um maior potencial adjuvante, resultando em uma titulação mais alta de anticorpos contra o BoHV-5.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p.114-117, 2005.
- FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 75, p. 247-253, 2008.
- 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.
- FISCHER, G. et al. Recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Suíça. v. 26, n. 3, p. 489-495, 2010.
- HENZEL, A. et al. Bovine alphaherpesvirus 1 and 5 in semen from bulls presenting genital lesions under field conditions in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 71, n. 1, p. 197-203, 2019.
- INTERNATIONAL Committee on Taxonomy of Viruses, Order Herpesvirales. 2022. Acessado: 30 Ago. 2023. Online. Disponível em: <<https://ictv.global/report/chapter/orthoherpesviridae/orthoherpesviridae/varicellovirus>>.
- NEWCOMER, B. W.; WALZ, P. H.; GIVENS, M. D. Potential applications for antiviral therapy and prophylaxis in bovine medicine. **Animal Health Research Reviews**. v. 15, n. 1, p. 102-117, 2014.
- PICOLI, T. et al. Caracterização química e ação antibacteriana de extrato de própolis marrom da região sul do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 4, p. 365-371, 2016.
- SILVA, L. F. D.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Immunogenicity of commercial inactivated bovine herpesvirus type 1 vaccines. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1471-1474, 2007.
- SILVA, L.C. et al. Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarreia viral bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 201-206, 2004.
- SPICKLER, A. R.; ROTH, J.A. adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 273-281, 2003.
- ZAJAC, M.P.D.M. et al. Biologia do herpesvírus bovino 5. **The Veterinary Journal**. p.138-145. 2010.