

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de
própolis verde e aquoso de própolis marrom em
camundongos inoculados com antígenos múltiplos**

Lílian das Neves Ferreira

Pelotas, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LÍLIAN DAS NEVES FERREIRA

Capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom em camundongos inoculados com antígenos múltiplos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Prof^ª. Dra. Silvia de Oliveira Hübner

Co-Orientador: Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2009

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

F383c Ferreira, Lilian das Neves

Capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom em camundongos inoculados com antígenos múltiplos / Lilian das Neves Ferreira. - Pelotas, 2009.
56f. : il.

Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009, Silvia de Oliveira Hübner, Orientador; co-orientador Geferson Fischer.

1. Própolis 2. Vacinas múltiplas 3. Sistema imunológico 4. Imunomodulação 5. Adjuvante I. Hübner, Silvia de Oliveira(orientador) II. Título.

CDD 636.089447

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Silvia de Oliveira Hübner – Universidade Federal de Pelotas

Dr. Geferson Fischer – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Niraldo Paulino – Universidade Bandeirante de São Paulo

Dedico esse trabalho para:

Meus pais, Nerli e Aldenir,
pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

Aos meus queridos pais, Nerli e Aldenir, e minha “mana”, Rosimeri, pelo apoio, incentivo, carinho e amor.

Ao meu namorado Daniel pelo apoio, ajuda e compreensão.

À minha orientadora Sílvia Hübner pela disposição, ajuda e sugestões.

Ao meu co-orientador Geferson Fischer pela sugestão da própolis, por tornar possível a execução desse trabalho, pela paciência, por tudo.

À minha colega de pós-graduação, Melissa, pela amizade e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária: Telmo Vidor, José Carlos Rösler Sandrini, Eliete Sandrini, Enilda Souza de Oliveira, Gilberto D’Avila Vargas, Clarissa Caetano Fonseca, Camila Vilela, Paula Finger, Lívia Munhoz, Bianca Siedler e Cristina Nunes, pela ajuda sempre que necessária, pela amizade e companheirismo.

Ao professor Milton Amado e todos os funcionários do Biotério Central pela ajuda, disposição e amizade.

Aos professores, funcionários e colegas do Centro de Biotecnologia.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Veterinária.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos por um período de seis meses.

A todos que colaboraram de alguma forma na execução deste trabalho.

Muito Obrigada

"Quando nada parece ajudar, eu vou e olho o cortador de pedras martelando sua rocha talvez cem vezes sem que nem uma só rachadura apareça. No entanto, na centésima primeira martelada, a pedra se abre em duas e eu sei que não foi aquela a que conseguiu, mas todas as que vieram antes."

(Jacob Riis)

RESUMO

FERREIRA, Lílian das Neves. **Capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom em camundongos inoculados com antígenos múltiplos.** 2009. 58f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Orientadora: Silvia de Oliveira Hübner. Co-orientador: Geferson Fischer.

As vacinas com antígenos múltiplos têm representado um grande avanço na imunização de animais de companhia e de produção, já que aliam economias de tempo, custo, manejo e estresse. No entanto, a eficiência dessas vacinas tem sido por vezes questionada e a escolha de um adjuvante adequado pode significar um avanço nas imunizações múltiplas. Nesse contexto, a própolis, que vem chamando a atenção de muitos pesquisadores devido as suas propriedades bioativas, surge como uma possível candidata, pois muitas pesquisas vêm demonstrando suas atividades moduladoras sobre o sistema imune humoral e celular. Como estudos já demonstraram atividade adjuvante em vacinas inativadas e monovalentes, mas ainda não existem relatos sobre sua ação em vacinas múltiplas e atenuadas, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom, contra o parvovírus canino (CPV) atenuado e o coronavírus canino (CCoV) inativado, quando associados com uma vacina composta por antígenos múltiplos. A própolis verde estimulou a produção de anticorpos contra o CPV nos animais inoculados com a maior concentração dos antígenos ($3,0 \times 10^6$ TCID₅₀) co-administrados com 400 µg de seu extrato etanólico. A adição de 400 µg/dose de extrato aquoso de própolis marrom a diferentes concentrações dos antígenos comerciais (0,75, 1,5 e $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀) incrementou a resposta imune humoral contra o CPV em todos os grupos. Com relação ao CCoV, a titulação dos anticorpos não revelou atividade adjuvante da própolis verde, no entanto foi verificado aumento na resposta humoral nos animais inoculados com 1,5 e $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀ dos antígenos co-administrados com extrato aquoso de própolis marrom. A resposta celular foi avaliada pela expressão de RNA mensageiro (mRNA) para interferon gamma (INF- γ), revelando que a própolis verde não apresentou ação imunoestimulante, já a própolis marrom incrementou a produção dessa citocina contra CPV nos animais inoculados com 0,75 e $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀ dos antígenos. A produção de INF- γ específico para CCoV revelou propriedade imunoestimulante da própolis verde nas concentrações de 0,75 e $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀ dos antígenos e da própolis marrom na dose de vacina de $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀. Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram que o extrato etanólico de própolis verde incrementou a resposta humoral contra o CPV e a celular contra o CCoV. Já o extrato aquoso de própolis marrom apresentou atividade adjuvante sobre as respostas imunes humoral e celular, contra o CPV atenuado e o

CCoV inativado, quando incorporado a uma vacina múltipla. O uso da própolis pode contribuir para a eficácia de vacinas múltiplas devido à atividade estimulante tanto sobre a resposta imune humoral como celular, justificando mais pesquisas nessa área.

Palavras-chave: própolis, vacinas múltiplas, sistema imunológico, imunomodulação, adjuvante.

ABSTRACT

FERREIRA, Lílian das Neves. **Immunomodulatory capacity of ethanolic extract of green propolis and aqueous extract of brown propolis in mice inoculated with multiple antigens.** 2009. 58f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Orientadora: Sílvia de Oliveira Hübner. Co-orientador: Geferson Fischer.

The vaccines with multiple antigens have represented a major advance in the immunization of pets and production animals, since they represent economies of time, cost, and stress. However, the efficiency of these vaccines have sometimes been questioned and the choice of an appropriate adjuvant can mean a breakthrough in multiple immunizations. In this context, propolis, which is drawing the attention of many researchers due to its bioactive properties, emerges as a possible candidate, because many studies have demonstrated its stimulating activity on the humoral and cellular immune system. As studies have shown adjuvant activity in inactivated and monovalent vaccines, but there are no reports on its action on multiple and attenuated vaccines, this study aimed at evaluating the immunomodulatory capacity of ethanolic extract of green propolis and aqueous extract of brown propolis, against attenuate parvovirus canine (CPV) and inactivated canine coronavirus (CCoV), when associated with a vaccine composed of multiple antigens. Green propolis stimulated the production of antibodies against CPV in animals inoculated with the highest concentration of antigen (3.0×10^6 TCID₅₀) co-administered with 400 mg/dose of its ethanolic extract. The addition of 400 mg/dose of aqueous extract of brown propolis to different concentrations of commercial antigens (0.75, 1.5 e 3.0×10^6 TCID₅₀) increased the humoral immune response against CPV in all groups. Regarding CCoV, green propolis showed no adjuvant activity. Already titration of the antibodies showed an increase in animals inoculated with 1.5 and 3.0×10^6 TCID₅₀ of antigens co-administered with aqueous extract of brown propolis. The cellular response was assessed by the expression of messenger RNA (mRNA) for interferon gamma (INF- γ), revealing that the green propolis showed no adjuvant activity, while the brown propolis increased the production of this cytokine against CPV in animals inoculated with 0.75 and 3.0×10^6 TCID₅₀ of antigens. The production of INF- γ specific to CCoV revealed properties immunostimulating agent of green propolis in concentrations of 0.75 and 3.0×10^6 TCID₅₀ of antigens and of brown propolis at a dose of vaccine of 3.0×10^6 TCID₅₀. The results presented in this study demonstrated that the ethanol extract of green propolis increased humoral response against CPV and cellular response against CCoV. And the aqueous extract of brown propolis has adjuvant activity on the humoral and cellular immune responses against the attenuated CPV and inactivated CCoV, when incorporated into a multiple vaccine. The use of propolis

may contribute to the effectiveness of multiple vaccines due its stimulating activity to both the humoral and cellular immune responses, which justifies more research in that area.

Key-words: propolis, vaccine with multiple antigen, immunological system, immunomodulation, adjuvant.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
3 ARTIGO 1.....	16
PRÓPOLIS: ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO	
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução.....	18
Ação da própolis sobre a resposta imune inata.....	20
Ação da própolis sobre a resposta imune específica.....	24
Atividade adjuvante da própolis em vacinas.....	28
Conclusão.....	29
Referências bibliográficas.....	30
4 ARTIGO 2.....	35
CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E AQUOSO DE PRÓPOLIS MARROM EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM ANTÍGENOS MÚLTIPLOS	
Resumo.....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAIS E METODOLOGIA.....	38
Extrato etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom.....	38
Animais.....	39
Inoculações e coleta de materiais.....	39
ELISA.....	40
RT-PCR.....	41
Análise estatística.....	42
RESULTADOS.....	42
ELISA.....	42
RT-PCR.....	43
DISCUSSÃO.....	43
AGRADECIMENTOS.....	47
REFERÊNCIAS.....	47
5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A vacinação foi comprovada ser a forma mais efetiva de controlar doenças infecciosas. Erradicação da varíola do mundo, eliminação da cólera suína e da brucelose da América do Norte, e, controle da aftosa são exemplos dos benefícios da utilização de vacinas efetivas. Desde o surgimento das primeiras vacinações realizadas por Jenner e Pasteur nos séculos XVIII e XIX (Bazin, 2003) até os dias atuais, houve uma grande evolução no desenvolvimento de vacinas. As vacinas tradicionais são compostas de patógenos vivos atenuados, de organismos inteiros inativados ou de toxinas bacterianas inativadas. A união desses antígenos em uma única vacina deu origem à chamada vacina múltipla, que alia economia de custo, menor estresse, otimiza manejo e tempo, pois uma aplicação seria capaz de estimular o sistema imune contra vários microorganismos ao mesmo tempo. No entanto, com o surgimento dessa modalidade de imunização, também surgiram questionamentos sobre a eficácia dessas vacinas e possíveis riscos à saúde (Phillips et al. 1989; Strasser et al. 2003), apesar dos fabricantes garantirem eficácia e inocuidade. Em uma pesquisa realizada por Hass et al. (2008) a análise de níveis de anticorpos contra cinomose canina (CDV) revelou que a maioria dos cães vacinados, 60,2% (48/80), não apresentava anticorpos ou apresentava em baixos títulos. Além disso, cães não vacinados ou animais com histórico de vacinação desconhecida apresentaram anticorpos em níveis protetores, sugerindo a ocorrência de imunização devido à exposição natural. Também foi avaliada a imunidade contra o parvovírus canino (CPV), sendo constatada presença de títulos de anticorpos ≥ 80 em 93,7% (75/80) dos cães vacinados, 90,9% (20/22) entre os não vacinados e 83,3% (85/30) nos animais com histórico de vacinação desconhecidos. A não diferença de imunidade entre os grupos evidencia que a imunidade instalada se deve mais a re-exposições naturais do que à vacinação (Hass et al. 2008). Os

resultados obtidos nesse trabalho podem indicar, entre outros fatores, que as vacinas múltiplas para caninos no Brasil não estão sendo eficientes.

A escolha de um adjuvante mais adequado pode indicar um avanço nas imunizações múltiplas, já que muitas vezes não é possível o uso de altas doses de antígenos, pois acarretaria em um volume muito grande de vacina ou na interferência de um vírus na atividade de outro (Krakowka et al. 1982). A maioria das vacinas está atrelada aos adjuvantes clássicos, como sais de alumínio e emulsões oleosas, que funcionam como adjuvantes de depósito promovendo uma liberação lenta do antígeno e estimulando, dessa forma, o sistema imune por mais tempo (Aguilar e Rodríguez, 2007). Contudo, muitas vacinas não necessitam desse sistema de entrega, como é o caso das vacinas atenuadas, já que os antígenos permanecem com capacidade de replicação no organismo hospedeiro. Isso não significa que essas vacinas não necessitem de substâncias que possam auxiliá-las no estímulo a uma resposta imune mais eficiente.

A própolis utilizada pelas abelhas na proteção da colméia (Pereira et al. 2002; Marcucci, 1996) surge também como um produto capaz de proteger o organismo contra agentes invasores (Orsi et al. 2000; Fischer et al. 2005) e modular o sistema imune (Hu et al. 2005; Song et al. 2002; Sy et al. 2006; Fischer et al. 2007a, 2007b). Essa atividade imunomoduladora tem chamado a atenção de muitos pesquisadores e, em especial, da nossa equipe de pesquisa no laboratório de virologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Experimentos do nosso grupo constataram atividade adjuvante da própolis quando incorporada a vacinas monovalentes e inativadas (Fischer et al. 2007a, 2007b). No entanto, a ação da própolis, incluindo a influência sobre o sistema imune, está ligada a sua composição química complexa, com mais de 300 substâncias já identificadas (De Castro, 2001), e variável com relação à ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (Bankova et al. 2000; Park et al. 2002). No Brasil, a própolis verde é produzida exclusivamente a partir de uma planta nativa da região sudeste, conhecida popularmente como alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) (Park et al. 2002), enquanto para a própolis marrom há uma grande diversidade vegetal para retirada de resina, o que dificulta a correlação da própolis com a fonte produtora. Essa variabilidade química associada a diferentes protocolos de extração dessas substâncias e adoção de metodologias distintas influencia na bioatividade da

própolis, o que leva muitas pesquisas a apresentarem resultados controversos (Fischer et al. 2008).

Tendo em vista a diversidade de amostras de própolis brasileira e o seu potencial efeito imunoestimulante, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade imunomoduladora de extratos etanólicos de própolis verde e extratos aquosos de própolis marrom, quando associados com uma vacina composta por antígenos múltiplos, através da mensuração de parâmetros da resposta imune humoral e celular em relação ao parvovírus canino e coronavírus canino.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Estimar a capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom, quando associados, de forma isolada, à vacina com antígenos múltiplos.

Objetivos Específicos

- Estimar o efeito dos extratos de própolis verde e marrom sobre a resposta imune humoral de camundongos através da titulação de anticorpos para os antígenos CPV e CCoV.

- Estimar o efeito da própolis verde e marrom sobre a resposta imune celular através da expressão de mRNA para IFN- γ .

3 ARTIGO 1

PRÓPOLIS: ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO

Submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia

Própolis: atividade sobre o sistema imunológico

Lílian das Neves Ferreira¹, Geferson Fischer^{1,2}, Silvia de Oliveira Hübner¹

¹ Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CP 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brasil;

² Centro de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

1

Resumo

A própolis é uma substância natural formada por uma mistura complexa de materiais resinosos e balsâmicos coletados pelas abelhas de diferentes partes das plantas, sendo usada para proteção da colméia. Na medicina popular, tem sido usada desde 300 aC devido as suas propriedades terapêuticas, e hoje em dia, em uma infinidade de preparações, como géis, soluções, saches, em função das suas propriedades anti-sépticas, antiinflamatórias e cicatrizantes. A própolis possui uma composição complexa, com mais de 300 substâncias já identificadas, que estão associados a atividades antivirais, bactericidas, anticarcinogênicas, antiinflamatórias, imunomoduladoras, entre outras. Essa vasta composição química é variável e está intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas, o que aliado a diferentes metodologias adotadas nos estudos científicos leva muitas pesquisas a apresentarem resultados controversos. O objetivo desse artigo foi revisar as variadas ações da própolis sobre o sistema imune inato e adquirido, ressaltando seu potencial efeito adjuvante em vacinas.

Palavras-chave: imunomodulação, sistema imune, adjuvante, vacina.

¹ Autor para correspondência: e-mail: liliannf@gmail.com; tel.: +55 53 32322791; fax: +55 53 32757498.

Propolis: activity on the immune system

Abstract

Propolis is a natural substance formed by a complex mixture of balsamic and resinous material collected by bees from different parts of plants, being used to protect the hive. In folk medicine, has been used since 300 BC due to its therapeutic properties, and today, in a myriad of preparations such as gels, solutions, creams, on its properties anti-septic, anti-inflammatory and healing. Propolis has a complex composition, with more than 300 substances already identified that are associated with antiviral, bactericidal, anti-tumor, anti-inflammatory, immunomodulatory, among others activities. This vast chemical composition is variable and is closely related to the ecology of the flora of each region visited by bees, which combined with different methodologies adopted in scientific research generate controversial results in many experiments. The aim of this article was to review the different actions of propolis on the innate and acquired immune system, highlighting its potential adjuvant effect in vaccines.

Key-words: propolis, immunomodulation, immune system, adjuvant, vaccine.

Introdução

A palavra própolis é derivada do grego *pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade (Pereira et al., 2002). Essa substância natural é formada por uma mistura complexa de materiais resinosos e balsâmicos coletados pelas abelhas de diferentes partes das plantas, tais como galhos, cascas, brotos e exsudato resinoso. Além disso, na colméia as abelhas alteram estas substâncias através da adição de produtos do seu metabolismo, como a enzima salivar β -glicosidase (Castaldo; Capasso, 2002; Park et al., 2002). As abelhas a utilizam para selar a colméia, revestir paredes internas, cobrir insetos

invasores e preparar o local para postura da abelha rainha (Marcucci, 1996). Na medicina popular, a própolis tem sido usada desde 300 aC, principalmente como cicatrizante e no tratamento de úlceras. Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito (1700 aC) a usavam para embalsamar cadáveres, por conhecerem suas propriedades anti-putrefativas (De Castro, 2001; Castaldo; Capasso, 2002; Sforcin, 2007). Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas (Pereira et al., 2002). Hoje em dia continua sendo usada em uma infinidade de preparações, como géis, soluções, saches, em função das suas propriedades anti-sépticas, antiinflamatórias e cicatrizantes.

Apesar da sua utilização desde os tempos mais remotos das civilizações gregas e egípcias, somente nas últimas décadas a composição química e as atividades biológicas da própolis têm sido mais intensamente avaliadas em estudos de diversos pesquisadores. A própolis possui uma composição complexa, com mais de 300 substâncias já identificadas (De Castro, 2001), das quais se destacam os polifenóis (De Castro, 2001; Castaldo; Capasso, 2002), que estão associados a atividades antivirais (Fischer et al. 2005), bactericidas (Orsi et al., 2000); anticarcinogênicas (Dusse et al. 2003; Orsolich et al. 2004); antiinflamatórias (Hu et al., 2005; Song et al., 2002; Sy et al., 2006), imunoestimulatórias (Fischer et al., 2007a, b), entre outros. A maioria dos polifenóis são flavonóides, ácidos fenólicos e seus esteres, aldeídos fenólicos e cetonas. Outros componentes da própolis incluem óleos voláteis e ácidos aromáticos, ceras, resinas, bálsamos e grãos de pólen, os quais são ricos em elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco (Dobrowolski et al., 1991). Essa vasta composição química é variável e está intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (Bankova et al., 2000; Park et al., 2002). Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte dominante de própolis é o exsudato do botão de

álamo (*Populus* sp.) (Bankova et al., 2000). Entretanto, na América do Sul a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa e uma grande diversidade vegetal é utilizada pelas abelhas para produção da própolis, dificultando a sua correlação com a fonte produtora (Park et al., 2002). No Brasil a amostra mais conhecida e estudada é a própolis verde, produzida a partir da resina coleta da planta *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim do campo (Teixeira et al., 2005). Essa variabilidade química associada a diferentes protocolos de extração das substâncias que compõem a própolis influenciam na sua bioatividade, o que leva muitas pesquisas a apresentarem resultados controversos (Fischer et al., 2008). Contudo, o valor da própolis para a medicina é incontestável, sendo necessária maior compreensão dos mecanismos de ação dos principais componentes, de forma isolada e conjunta.

O objetivo desse artigo foi revisar as variadas ações da própolis sobre o sistema imune inato e adquirido, ressaltando seu potencial efeito adjuvante, de forma a favorecer a medicina preventiva.

Ação da Própolis sobre a Resposta Imune Inata

Muitas pesquisas têm revelado que a própolis exerce influência sobre o sistema imune inato, principalmente em células especializadas na fagocitose e apresentação de antígenos, os macrófagos (Song et al., 2002; Orsolich et al., 2003, 2004; Hu et al., 2005; Orsi et al., 2000, 2005). A ação da própolis sobre essas células atrai o interesse de imunologistas, visto que estas são células chaves do sistema imune inato, responsáveis por fagocitose, liberação de enzimas, geração de radicais livres, participação como mediadores nos processos inflamatórios, apresentação de antígenos, entre outras funções. A própolis estimula macrófagos aumentando a capacidade fagocítica, secreção de citocinas, peróxido de oxigênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (Orsi et al., 2000). Orsi et al. (2005) constataram que amostras de própolis do Brasil e da Bulgária aumentaram de forma significativa a atividade bactericida de

macrófagos contra *Salmonella typhimurium* através da elevação de metabólitos como o NO e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sem excluir o envolvimento de outros fatores. Outros pesquisadores também constataram que a síntese de metabólitos como NO e H_2O_2 está atrelada à capacidade dos macrófagos de destruição de microorganismos (Orsi et al., 2000) e também de células tumorais (Dusse et al., 2003; Orsolich et al., 2004). O aumento no metabolismo oxidativo é um forte marcador que distingue macrófagos ativados de não ativados, e, os intermediários de oxigênio (O_2) exercem atividade contra o parasita intracelular *Toxoplasma gondii*, tanto *in vitro* como *in vivo*. (Murray; Cohn, 1980).

O potencial anti-carcinogênico da própolis foi observado quando macrófagos peritoniais de camundongos tratados com derivados de própolis solúveis em água (WSDP), ácido cafeico (CA) ou éster feniletil do ácido cafeico (CAPE) mostraram-se citotóxicos para células tumorais (HeLa) *in vitro*. Essa citotoxicidade foi associada a uma maior produção de NO pelos macrófagos nos animais que receberam WSDP e CAPE (Orsolich et al., 2004). Orsolich e Basic (2003) comprovaram a atividade antitumoral dos WSDP de amostras brasileiras e croatas de própolis. Tal atividade foi atribuída à estimulação de macrófagos de forma inespecífica e a um maior estímulo de linfócitos CD8+. A capacidade antitumoral da própolis também foi atribuída a estímulo sobre células “natural killer” (NK), quando soluções hidroalcoólicas de própolis brasileira, administradas a camundongos pela via oral durante três dias, incrementaram a citotoxicidade das NK contra células tumorais *in vitro*. O exato mecanismo de ação sobre essas células permanece desconhecido. No entanto, os autores acreditam que a própolis possa ter estimulado macrófagos a produzirem citocinas como TNF- α e IL-12, as quais ativaram as NK (Sforcin et al., 2002).

Em contrapartida, outros estudos constataram potencial inibitório sobre macrófagos, indicando benefício no tratamento de várias patologias. Extratos etanólicos de própolis (EEP), nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, inibiram a produção de NO por macrófagos

estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) associado ao INF- γ (Song et al., 2002). Segundo estes pesquisadores, os resultados revelaram o potencial antiinflamatório dos EEP, já que os metabólitos gerados pelos macrófagos podem causar danos teciduais e estarem relacionados a doenças autoimunes e sintomas clássicos de inflamação (Orsi et al., 2000; Dusse et al., 2003). O mesmo efeito também foi verificado por Hu et al. (2005), que demonstraram inibição na produção de prostaglandina E2 (PGE₂) e NO no exsudato de pleurisia, induzida por carragenina. Também houve diminuição da reciprocidade entre PGE₂ e NO e diminuição na ativação do "efeito dominó" entre várias enzimas, o que, por sua vez, poderia diminuir o grau de uma reação inflamatória. Segundo Sforcin (2007) o maior obstáculo em relação à própolis não reside na ausência de sua padronização, mas sim na falta de protocolos pré-estabelecidos para os ensaios imunológicos, já que os pesquisadores empregam variadas concentrações da própolis *in vitro* e *in vivo*, bem como diferentes extratos, períodos e vias de administração.

O incremento ou decréscimo na produção de NO e H₂O₂ pelos macrófagos parece mesmo estar associado à concentração e composição da própolis e protocolos de uso. Quando macrófagos peritoneais de camundongos foram cultivados e estimulados *in vitro* com diferentes concentrações de soluções hidroalcoólicas (PHS) de própolis, não foi observado incremento na produção de H₂O₂ ou NO em qualquer tratamento com própolis. Já no experimento *in vivo* foi constatado que os macrófagos peritoneais (estimulados com INF- γ *in vitro*) dos camundongos que receberam 250 e 500 μ g/mL de PHS, pela via oral, durante três dias consecutivos, produziram mais H₂O₂ em relação aos macrófagos dos animais não tratados com própolis (p<0,001). Por outro lado, nos macrófagos dos camundongos que receberam 3000 e 6000 μ g/mL de PHS houve inibição na liberação de H₂O₂, na presença de estímulo por INF- γ (p<0,001) (Orsi et al., 2000). Ainda na pesquisa de Orsi et al. (2000) foi verificado também diminuição significativa na produção de NO nos animais tratados com 1000, 3000 e 6000 μ g/ml de PHS, na presença de estímulo por INF- γ . Ivanovska et al.

(1995a) observaram que o ácido cinâmico tende a inibir a liberação de H_2O_2 por macrófagos peritoneais, enquanto o ácido cafeico incrementa a produção desse metabólito. A esses resultados soma-se o experimento de Missima e Sforcin (2008) que concluíram que extrato etanólico de própolis brasileira administrado a camundongos experimentalmente estressados potencializou a geração de H_2O_2 , sugerindo estímulo à ativação de macrófagos e inibição na produção de NO.

Outro mecanismo de defesa não específico do hospedeiro é o sistema complemento, que tem a função de opsonizar patógenos e desencadear uma série de reações inflamatórias para auxiliar no combate à infecção. No entanto, o complemento não representa apenas ameaça aos antígenos, mas uma resposta muito intensa pode gerar danos às células e aos tecidos do hospedeiro (Iturry-Yamamoto; Portinho, 2001). Pesquisas têm demonstrado que a própolis também exerce influência sobre esse mecanismo de defesa. Ivanovska et al. (1995b) constataram que derivados de própolis solúveis em água (WSDP) inibiram *in vitro* o sistema complemento, tanto pela via clássica como pela via alternativa, e atribuíram essa atividade a inibição da C3 convertase pelos flavonóides e compostos fenólicos. Os mesmos pesquisadores, em experimento *in vivo*, demonstraram que WSDP, administrados a camundongos pela via intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV), incrementaram a atividade do sistema complemento pela via alternativa na primeira hora após a inoculação, seguido de decréscimo e retorno aos níveis normais em 24 horas. Já a aplicação pela via oral (PO) não teve influência sobre o complemento. Essas mesmas vias e doses dos WSDP foram administradas a camundongos tratados previamente com zymosan para induzir edema em membros. As aplicações pelas vias IP e IV causaram diminuição moderada de todos os estágios do edema de membros. O efeito de inibição de edema mais pronunciado foi verificado nos animais que receberam WSDP 18 horas antes da aplicação de zymosan. Os autores observaram que o processo de formação do edema diminuiu no período de aumento

da atividade do complemento, também verificaram que o pico de formação de edema coincidiu com a fase de decréscimo do complemento (Ivanovska et al., 1995c).

A própolis é uma substância com importante atividade imunomoduladora sobre a resposta imune inata, protegendo o organismo contra invasores, doenças tumorais e até mesmo contra respostas imunes exacerbadas que possam representar risco à vida. Segundo Ivanovska et al. (1995c) a avaliação de componentes de forma isolada permite uma interpretação mais precisa dos dados, no entanto o efeito aditivo de inúmeros compostos acaba sendo perdido. Por outro lado, o conteúdo complexo da própolis também pode resultar em efeitos antagônicos. Além disso, os vários componentes têm diferentes ciclos metabólicos e a manifestação de determinada bioatividade depende da via da aplicação (Ivanovska et al., 1995c).

Ação da Própolis sobre a Resposta Imune Específica

A imunomodulação pela própolis não se limita à imunidade inata, mas abrange também a resposta imune adaptativa, com influência tanto na resposta imune celular como na humoral. Na composição química da própolis existem componentes com função estimulante sobre a proliferação de linfócitos e outros com ação supressora. A manifestação de uma atividade em detrimento de outra depende do componente analisado, da quantidade de cada constituinte presente na amostra, da forma como esses constituintes são obtidos e do protocolo adotado no ensaio imunológico (Sforcin, 2007). A associação do ácido cinâmico, componente da própolis, com L-lisina apresentou efeito protetor contra *Klebsiella pneumoniae*, quando administrado a camundongos pela via intraperitoneal, por três dias consecutivos antes do desafio. Os autores atribuíram esse efeito à capacidade do complexo em estimular a proliferação de linfócitos esplênicos e tímicos, estimular a proliferação na presença de mitógenos e incrementar a liberação de interleucina 1(IL-1) e IL-2 (Ivanovska

1995a). Já Sá-Nunes (2003) constataram efeito inibitório de uma solução hidroalcoólica de própolis brasileira sobre linfócitos, *in vitro*, e atribuíram aos flavanóides ou ao sinergismo entre os componentes esse efeito imunossupressor. O ácido cinâmico, ao qual foi atribuída atividade estimulante sobre linfócitos na pesquisa de Ivanovska (1995a), estava presente nessa amostra de própolis em quantidade inferior a 3%. A pesquisa de Orsolich et al. (2004) também confirma a ação diferenciada de constituintes da própolis em esplenócitos de camundongos tratados com 50 mg/kg de WSDP ou ácido cafeico (CA), pela via intravenosa. Os esplenócitos foram cultivados com diferentes mitógenos e no grupo que recebeu CA foi observado efeito supressor intenso em relação a proliferação dos esplenócitos, enquanto que no grupo que recebeu WSDP houve efeito proliferativo.

Aliada à ação sobre linfócitos está a influência da própolis na produção de citocinas, em especial, INF- γ . Em camundongos tratados com 2,5 e 5 mg/kg de solução hidroalcoólica de própolis, pela via intraperitoneal, durante três dias consecutivos, foi observado inibição da proliferação de linfócitos esplênicos estimulados com Concanavalina A aliado a aumento na produção de INF- γ . A hipótese dos autores é que a própolis tenha pré-ativado os macrófagos *in vivo*, estimulando a produção de INF- γ e NO, o qual inibiu a proliferação dos linfócitos. O NO é responsável por inibição na síntese de DNA em algumas células, o que teria provocado a depressão na proliferação dos linfócitos (Sá-Nunes et al., 2003). Os estudos de Fischer et al. (2007b) também comprovaram aumento na expressão de mRNA para INF- γ , em esplenócitos de camundongos, induzido pela própolis verde brasileira (5 mg/kg). Em outro experimento, a análise do ester feniletil do ácido cafeico (CAPE), um componente ativo da própolis, fornecido em diferentes concentrações (0, 5, 10 e 20 mg/kg) a camundongos, pela via oral, durante 14 dias, diminuiu significativamente o número de células do baço e timo, e, o peso do timo, revelando um decréscimo numérico das células imunes, principalmente, de células T. A hipótese dos pesquisadores é que esse efeito tenha sido provocado por indução de

apoptose pelo CAPE. Na dose de 20 mg/kg houve estímulo a blastogênese de células T na presença de Concanavalina A (Con A), enquanto nenhum efeito foi observado em linfócitos B estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Não foram observadas mudanças nas subpopulações de linfócitos, células B ou T, embora entre os linfócitos T tenha havido incremento nas células CD4+. Nessa concentração mais elevada de CAPE também foi constatado aumento significativo das citocinas IL-2, IL-4 e INF- γ , e os autores atribuíram esse efeito ao aumento das células T auxiliares (Th) (Park et al., 2004). Na pesquisa de Kimoto et al. (1998) outro componente presente na própolis brasileira, o artepillin C®, também mostrou incremento na relação de células T CD4/CD8 e no número total de linfócitos auxiliares, aliado a supressão de crescimento tumoral, após a injeção intra-tumoral de 500 mg desse componente, três vezes por semana.

Esses resultados que indicam estímulo à imunidade celular, através do aumento nos níveis de INF- γ e incremento na produção de linfócitos T CD4+, somam-se a outra pesquisa que demonstrou estímulo de linfócitos Th1 (resposta celular) e inibição de linfócitos Th2 (resposta humoral), revelando características antiinflamatórias da própolis. Nessa pesquisa a atividade imunomoduladora, verificada pela inibição de células Th2 e estimulação de Th1, foi observada quando extrato aquoso de própolis foi fornecido pela via oral a camundongos com as vias aéreas sensibilizadas com ovoalbumina (OVA). A própolis diminuiu a produção de IgE e IgG₁ específicas para OVA, bem como a liberação de IL-6 e IL-10, revelando potencial terapêutico em doenças crônicas, como no caso da asma (Sy et al., 2006). Hu et al. (2005), usando extrato etanólico de própolis (EEP) e derivados solúveis em água (WSD), também demonstraram efeitos inibitórios nos níveis de IL-6, mas não nos níveis de INF- γ e IL-2, em artrite induzida por adjuvante completo de Freund (FCA) em ratos. As células Th1 secretam IL-2, INF- γ , fator de necrose tumoral beta (TNF- β), IL-12 e IL-18, estimulando primariamente a resposta imune mediada por células. Já as células Th2 caracteristicamente

secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, após a exposição a um antígeno, agindo na proliferação de células B e na secreção de imunoglobulinas (resposta humoral). O conhecimento dos mecanismos de ação e funções dos linfócitos Th1/Th2 permite a compreensão da patogênese de várias condições fisiopatológicas, e proporciona a base para o desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas (Romagnani, 1997).

Por outro lado, Girgin et al. (2005) constataram inibição no níveis de INF- γ . Extratos etanólicos de seis amostras de própolis da Turquia adicionados a células mononucleares do sangue periférico inibiram, em uma relação dose-dependente, os níveis de INF- γ e TNF- α , a liberação de neopterin e degradação de triptofano. Segundo os autores a inibição na liberação de neopterin e degradação do triptofano foi consequência do decréscimo no nível de INF- γ , já que essa citocina induz os macrófagos a liberarem neopterin e muitas células a aumentarem a atividade da enzima indolamina, que converte o triptofano em quinurenina e ácido quinolínico (Widner et al. 2000). Esse efeito da própolis turca foi considerado benéfico à saúde devido à produção de neopterin e degradação de triptofano estarem ligadas a muitas desordens patológicas, como doenças infecciosas, autoimunes e neurológicas (Widner et al., 2000; Vismari et al., 2008).

Apesar da maioria das pesquisas terem revelado tendência da própolis em estimular linfócitos T, em especial Th1, revelando estímulo à resposta imune celular, esse apiterápico também exerce influência na imunidade humoral. Sforcin et al. (2005) avaliaram a ação de extrato etanólico da própolis brasileira e búlgara, bem como o CAPE e a quercetina, separadamente, sobre a produção de anticorpos em ratos inoculados com albumina bovina. Ambas as amostras estimularam aumento na produção de anticorpos, o que representa uma atividade adjuvante, enquanto que os compostos, de forma isolada, não apresentaram efeitos sobre a resposta humoral. Estes pesquisadores atribuíram esses resultados à ação conjunta das diversas substâncias e não a um ou outro componente de forma isolada. No experimento de

Park et al. (2004), no qual foi observado incremento nos linfócitos T auxiliares, também foi constatado que o número de células formadoras de placa (PFC), anticorpos IgMs, do baço dos camundongos tratados com CAPE aumentaram significativamente. Os autores acreditam que o incremento no número de PFC foi devido ao aumento dos linfócitos auxiliares, já que a produção de IgM se deve a cooperação entre células B, macrófagos e também células T auxiliares.

Atividade adjuvante da própolis em vacinas

O uso de adjuvantes em vacinas, muitas vezes, se faz necessário para potencializar e tornar mais duradoura a resposta imunológica, especialmente frente a antígenos inativados ou recombinantes (Fischer et al., 2008). Neste sentido, novas substâncias têm sido constantemente avaliadas, embora as vacinas veterinárias continuem sendo compostas pelo hidróxido de alumínio ou as emulsões oleosas como adjuvantes. Além disso, o hidróxido de alumínio é o único adjuvante permitido para uso humano (Aguilar; Rodríguez, 2007). Nesse contexto, a própolis sinaliza como uma alternativa em potencial, tendo em vista suas ações sobre o sistema imune, avaliada frente a diversos antígenos vacinais (Fischer et al., 2008).

Embora recentes, as pesquisas avaliando a ação adjuvante da própolis em vacinas demonstram resultados animadores. O extrato aquoso de própolis de abelhas *Apis mellifera* demonstrou propriedade adjuvante quando associado a uma vacina inativada contra *Aeromonas hydrophila* em carpas, aumentando o título de anticorpos e elevando a taxa de sobrevivência ao desafio (Chu, 2006). Além disso, nosso grupo de pesquisa tem avaliado o uso da própolis em vacinas, estimando o seu potencial como substância adjuvante. A associação de 40 mg/dose de extrato etanólico de própolis verde brasileira com uma vacina oleosa contra herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) resultou em incremento significativo ($p < 0,01$) nos níveis de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5, quando comparado com a

resposta humoral induzida pela mesma vacina sem própolis (Fischer et al., 2007a). Em outro estudo, quando extrato etanólico de própolis verde (5 mg/dose) foi adicionado a uma vacina contra o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) contendo hidróxido de alumínio, e administrada a camundongos, houve aumento significativo na resposta humoral quando comparado ao grupo inoculado com a mesma vacina sem própolis e ao grupo que recebeu somente antígeno e própolis, sem hidróxido de alumínio. No entanto, após desafio com SuHV-1, a própolis proporcionou aumento no percentual de animais protegidos, inoculados com vacinas com e sem hidróxido de alumínio. O aumento na proteção dos camundongos que receberam apenas própolis e antígeno foi atribuído ao estímulo da resposta celular, uma vez que foi verificado aumento na expressão de mRNA para INF- γ . Esse experimento demonstrou que a própolis estimulou tanto a resposta humoral como a celular contra o SuHV-1 (Fischer et al., 2007b), claramente modulando o sistema imune dos camundongos. Mais recentemente, a associação de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom a uma vacina com antígenos múltiplos inativados e atenuados, permitiram constatar que extrato aquoso de própolis marrom possui atividade adjuvante sobre as respostas imunes humoral e celular contra o parvovírus canino (CPV) atenuado e o coronavírus canino (CCoV) inativado. Já o extrato etanólico de própolis verde incrementou a resposta humoral contra o CPV e a celular contra o CCoV (comunicação pessoal, 2009).

Conclusão

A imunomodulação pela própolis tem sido observada tanto na estimulação do sistema imune no combate a agentes invasores e doenças neoplásicas, como na sua inibição, no caso de doenças crônicas ou respostas imunes muito intensas que possam trazer risco à vida. O aumento nos títulos de anticorpos e de INF- γ indicam que a própolis pode ser usada como adjuvante em vacinas. No entanto, devido à complexidade química, os mecanismos de ação

da própolis, bem como protocolos de uso mais apropriados ainda não puderam ser completamente estabelecidos, principalmente no que diz respeito a sua utilização como adjuvante em vacinas, o que ressalta a necessidade de realização de novas pesquisas, que venham contribuir para elucidar as lacunas ainda existentes.

Referências Bibliográficas

- Aguilar JC, Rodríguez EC 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25: 3752-62.
- Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U 2003. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Zeitschrift für Naturforschung* 58c: 580-589.
- Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31: 3-15.
- Castaldo S, Capasso F 2002. Própolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 1: S1-S6.
- Chu WH 2006. Adjuvant effect of própolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish & Shellfish Immunology* 21: 113-117.
- De Castro SL 2001. Própolis: Biological and Pharmacological Activities. *Ann Rev Biomed Sci* 3: 49-83.
- Dobrowolski JW, Vohora SB, Kalpana S, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on própolis bee products. *Journal of Ethnopharmacol* 35: 77-82.
- Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG 2003. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 39(4): 343-350.

Fischer G, Dummer LA, Vidor T, Paulino N, Paulino AS 2005. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. *Proceedings of the 7th Encontro de pós-graduação*. Pelotas, Brasil.

Fischer G, Cleff MB, Dummer LA, Paulino N, Paulino AS, Vilela CO et al. 2007a. Adjuvant effect of green própolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet Immunol Immunopathol* 116: 79-84.

Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Dummer LA, Vargas GD, Hübner SO et al. 2007b. Immunomodulation produced by green própolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 25: 1250-56.

Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T 2008. Imunomodulação pela própolis. *Arquivo do Instituto Biológico* 75(2): 247-253.

Girgin G et al. 2005. Immunomodulatory effects of Turkish propolis: Changes in neopterin release and tryptophan degradation. *Immunobiology* doi:10.1016/j.imbio.2008.07.002

Hu F, Hepburn HR, Yinghua L, Chen M, Radloff SE, Daya S 2005. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J. Ethnopharmacol* 100: 276-83.

Iturry-Yamamoto GR, Portinho CP 2001. Sistema Complemento: Ativação, Regulação e Deficiências Congênitas e Adquiridas. *Revista da Associação Médica Brasileira* 47(1): 41-45.

Ivanovska N, Neychev H, Stefanova Z, Bankova V, Popov S 1995a. Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation, cytokine release and *Klebsiella* infection in mice. *Apidologie* 26: 73-81.

Ivanovska ND, Dimov VB, Pavlova S, Bankova VS, Popov SS 1995b. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. *Journal of Ethnopharmacology* 47:135-143.

Ivanovska ND, Dimov VB, Bankova VS, Popov SS 1995c. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo. *Journal of Ethnopharmacology* 47: 145-147.

Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M, Mito K 1998. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev* 22(6): 506–15.

Marcucci MC 1996. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova* 19(5): 529-536.

Missima F, Sforcin JM 2008. Green brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 5: 71-75. doi: 10.1093/ecam/nel112

Murray HW, Cohn ZA 1980. Antimicrobial activity III. Enhanced oxidative metabolism as an expression of macrophages activation. *The Rockefeller University* 152: 1596-1609.

Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, et al. 2000. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 6(2): 205-19.

Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Bankova V 2005. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. *International Immunopharmacology* 5:359-368.

Orsolich N, Basic I 2003. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *Journal of Ethnopharmacology* 84: 265-273.

Orsolich N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I 2004. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 307-315.

Park YK, Alencar SM, Scamparini, ARP, Aguiar CL 2002. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural* 32(6): 997-1003.

Park JH, Lee JK, Kim HS et al. 2004. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *International Immunopharmacology* 4: 429-436.

Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino NFR 2002. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova* 25: 321-326.

Romagnani R 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Efis Overview Immunology Today* 18(6): 263-266.

Sá-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM 2003. Propolis: lymphocyte proliferation and INF- γ production. *Journal of Ethnopharmacology* 87: 93-97.

Sforcin JM, Kaneno R, Funari SRC 2002. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. *J. Venom. Anim. Toxins* 8(1). Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79302002000100003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79302002000100003&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 20 Feb. 2009. doi: 10.1590/S0104-79302002000100003.

Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V 2005. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 301-305.

Sforcin JM 2007. Propolis and immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113: 1-14.

Song YS, Park EH, Hur GM, Ryu YS, Kim YM, Jin C 2002. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *J. Ethnopharmacol* 80: 155-61.

Sy LB, Wu YL, Chiang BL, Wang YH, Wu WM 2006. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *Int. Immunopharmacol* 6: 1053-60.

Teixeira EW, Negri G, Meira RMSA, Message D, Salatino A 2005. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy. *Oxford University Press* 2(1): 85-92.

Disponível em: <
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1062148&blobtype=pdf>>. Acesso em: 19 Fev. 2009. doi: 10.1093/ecam/neh055

Vismari L, Alves GJ, Neto JP 2008. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Rev Psiq Clín* 35(5): 196-204.

Widner B, Ledochowski M, Fuchs D 2000. Interferon- α induced tryptophan degradation: neuropsychiatric and immunological consequences. *Current Drug Metabolism* 1(2): 193-204. doi 10.2174/1389200003339063.

4 ARTIGO 2

CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS ETANÓLICO DE PRÓPOLIS
VERDE E AQUOSO DE PRÓPOLIS MARROM EM CAMUNDONGOS
INOCULADOS COM ANTÍGENOS MÚLTIPLOS

Submetido a The Open Immunology Journal

CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E AQUOSO DE PRÓPOLIS MARROM EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM ANTÍGENOS MÚLTIPLOS

Lílian das Neves Ferreira^a, Geferson Fischer^{a,b*}, Niraldo Paulino^c, Clarissa Fonseca Caetano^a,
Paula Fonseca Finger^a, Livia Silveira Munhoz^a, Bianca Sica Siedler^a, Camila de Oliveira Vilela^a, Telmo Vidor^a,
Gilberto D'Ávila Vargas^a e Silvia de Oliveira Hübner^a

^a - *Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CP 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brasil;*

^b - *Centro de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil;*

^c - *Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Biomedicamentos/Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN), Rua Maria Candida, 1813, 02071-013, São Paulo, SP, Brasil;*

Autor para correspondência: Rua Carlos de Carvalho, 372/401, 96030-270 – Pelotas – RS – Brazil.

Tel.: +55 53 32757498; fax: +55 53 32757498. E-mail address: geferson.fischer@gmail.com (G. Fischer).

Resumo

A capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom, foi avaliada contra o parvovírus canino (CPV) e o coronavírus canino (CCoV), quando associados com uma vacina composta por antígenos múltiplos. A adição de 400 µg/dose de extrato de própolis marrom nas diferentes concentrações dos antígenos avaliadas ($0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e $3,0 \times 10^6$ doses infectantes para 50% dos cultivos celulares / $25 \mu\text{l}$ - TCID_{50}) incrementou a resposta imune humoral contra o CPV. A própolis verde (400 µg/dose) aumentou a produção de anticorpos contra o CPV nos animais inoculados com a maior concentração dos antígenos. Para o CCoV a própolis marrom aumentou os níveis de anticorpos nos animais vacinados com $1,5$ e $3,0 \times 10^6$ TCID_{50} dos antígenos, enquanto que a própolis verde não incrementou a resposta humoral. Houve maior expressão de mRNA para $\text{INF-}\gamma$ contra o CPV em animais que receberam a própolis marrom associada a $0,75$ e $3,0 \times 10^6$ TCID_{50} dos antígenos, enquanto a própolis verde não apresentou essa atividade. A produção de $\text{INF-}\gamma$ para CCoV revelou propriedade imunoestimulante da própolis marrom na maior concentração de antígenos e da própolis verde nas concentrações de $0,75$ e $3,0 \times 10^6$ TCID_{50} . Os resultados demonstraram que o extrato aquoso de própolis marrom possui atividade adjuvante sobre as respostas imunes humoral e celular contra o CPV e o CCoV. O extrato etanólico de própolis verde incrementou a resposta humoral contra o CPV e celular contra o CCoV.

Palavras-chaves: própolis, imunomodulação, parvovírus canino, coronavírus canino, vacina.

INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas *Apis mellifera* a partir de materiais coletados em diferentes partes das plantas, como brotos, casca, botões florais e exsudatos resinosos. Além disso, na colméia as abelhas alteram estas substâncias através da adição de secreções salivares e enzimas [1,2]. A sua composição química é variável e está intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região, visitada pelas abelhas [3,2]. Enquanto na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a principal fonte para a produção de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp.), 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*) [2]. Em relação à própolis marrom, há uma grande diversidade vegetal para retirada de resina, o que dificulta a correlação entre a própolis e a sua fonte produtora. Relatos sobre características medicinais da própolis são antigos, e já eram descritas por médicos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno [1]. Atualmente, diversos experimentos têm demonstrado atividades antiviral [4], bactericida [5], anticarcinogênica [6, 7], antiinflamatória [8, 9, 10] e imunomoduladora [11, 12] da própolis, entre outros. A sua atividade imunoestimulante tem chamado a atenção do nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Virologia e Imunologia, da Universidade Federal de Pelotas (Brasil), pela ação adjuvante em vacinas inativadas [11, 12]. No entanto, não há informações a respeito dessa atividade em vacinas compostas de antígenos múltiplos atenuados.

Tendo em vista a diversidade de amostras de própolis brasileira e o seu potencial efeito imunoestimulante, esse estudo teve como objetivo avaliar a capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom, quando associados com uma vacina composta por antígenos múltiplos. Para tal, foram analisados parâmetros da resposta imune humoral e celular em relação ao parvovírus canino e coronavírus canino, utilizando-se camundongo como modelo biológico.

MATERIAIS E METODOLOGIA

Extrato etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom

A própolis verde foi obtida da Nectar Farmacêutica Ltda. (Brasil) e estocada a -20°C. O extrato etanólico foi preparado como descrito anteriormente [13]. Resumidamente, a própolis foi triturada e macerada com uma solução de extração contendo etanol absoluto, com agitação diária de 10 minutos, durante 10 dias. Então, o solvente foi evaporado e a matéria seca resultante foi dissolvida em tampão fosfato (pH 6.2), numa concentração final de 40 mg/mL.

A própolis marrom foi obtida da Apis Nativa Produtos Naturais Indústria e Comércio Ltda. (Brasil) e estocada a -20°C . Para obtenção do extrato aquoso, a própolis foi triturada e a extração foi feita em água destilada a 70°C , com agitação por 12 horas. Após filtração para retirada das partículas de maior granulometria, o extrato aquoso foi liofilizado (Edwards High Vacuum). A matéria seca obtida foi ressuspensa em meio Eagle (DMEM, SIGMA), numa concentração final de 100 mg/mL, e esterilizada em filtro Millipore.

Animais

Foram utilizados 120 camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmea, com quatro a seis semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram manejados segundo padrões pré-estabelecidos para a espécie [14] e a eutanásia seguiu as normas estabelecidas pela resolução de número 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária [15]. A condução do experimento foi aprovada pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEAA/UFPe).

Inoculações e coleta de materiais

A avaliação das propriedades adjuvantes dos extratos etanólico da própolis verde e aquoso da própolis marrom foi feita através da sua co-administração com uma vacina comercial contendo antígenos múltiplos, utilizada para caninos. A vacina continha sete antígenos vivos atenuados, incluindo o parvovírus canino (CPV), e um diluente contendo o antígeno de coronavírus canino (CCoV), inativado por irradiação ultravioleta e adsorvido ao hidróxido de alumínio, os quais foram avaliados quanto a parâmetros das respostas imunes humoral e celular.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 12 grupos de dez animais. Os grupos 1, 2 e 3 (controles negativos), foram inoculados com solução salina tamponada (PBS), PBS acrescida de 400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis verde e PBS acrescida de 400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis marrom, respectivamente. Os grupos 4, 5 e 6 receberam apenas vacina comercial nas doses $0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e $3,0 \times 10^6$ TCDI₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares / 25 μl), respectivamente. Os animais dos tratamentos 7, 8 e 9 receberam as diferentes doses da vacina ($0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e $3,0 \times 10^6$ TCDI₅₀, respectivamente) acrescidas de 400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ do extrato etanólico de própolis verde, enquanto que os demais (grupos 10, 11 e 12) foram inoculados com a vacina de antígenos múltiplos ($0,75 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e $3,0 \times 10^6$ TCDI₅₀, respectivamente) associada a 400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de extrato aquoso de própolis marrom. Foram realizadas três inoculações por via subcutânea, com intervalo de 30 dias, na

região pré-escapular. A coleta de sangue para mensuração dos títulos de anticorpos foi realizada 21 dias após a terceira inoculação, através de punção do plexo venoso retro-ocular, com os animais previamente anestesiados [14]. As amostras de soro foram inativadas a 56°C por trinta minutos, e armazenadas a -70°C até o momento do uso. 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 INF- γ , como forma de avaliação da resposta imune celular.

ELISA

O teste de ELISA indireto foi realizado para mensurar os níveis de anticorpos (IgG totais), contra o CPV e o CCoV, de acordo com o método descrito por Voller [16] e por Pratelli et al. [17], com pequenas adequações. A obtenção dos antígenos para sensibilização das placas foi feita através da infecção de culturas de células Crandell de rim de felino (CrFK) com CPV cepa Cornell (ATCC-VR 2017) ou CCoV cepa Mav 795 (cedida pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria - Brasil). Após 24 horas de infecção, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 250 x g por 20 minutos para remoção de restos celulares. O sobrenadante do centrifugado de CPV foi diluído (1:200) em tampão carbonato (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM [pH 9,6]). Já o CCoV foi novamente centrifugado (140000 x g), a 4 °C, durante uma hora. O precipitado obtido foi ressuspensionado em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2) em uma diluição de 1:80 do volume inicial. Para realização do teste, essa suspensão foi novamente diluída a 1:800 em tampão carbonato (pH 9,6). O teste foi realizado em placas de poliestireno contendo 96 cavidades, sensibilizadas com CPV (1:200) ou CCoV (1:800), por um período de 12 horas de incubação a 4°C. Todos os procedimentos de lavagem, bloqueio e diluição foram realizados com PBS contendo 0,05% de Tween 80 para CPV ou PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 para CCoV. As reações inespecíficas foram bloqueadas com soro fetal bovino a 5%. Os soros dos camundongos foram testados em duplicata, diluídos a 1:50. Foi utilizado o conjugado de cabra anti-imunoglobulina G (IgG) de camundongo, marcado com peroxidase (Sigma). Após uma hora de incubação, a solução cromógena (ortofenil diamina - OPD), foi adicionada às placas e essas incubadas por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor Thermo Plate (TP-Reader) nos comprimentos de onda 450 nm para CPV e 405 nm para CCoV.

RT-PCR

Os níveis de expressão do RNA mensageiro (mRNA) para interferon gamma (INF- γ) nos esplenócitos dos camundongos foram usados como parâmetros para avaliação da resposta imune celular. Os esplenócitos foram processados de acordo com Bastos et al. [18]. Resumidamente, um pool de esplenócitos foi obtido a partir do baço de quatro animais de cada tratamento, 30 dias após a terceira inoculação. Após a lise dos eritrócitos com cloreto de amônio (NH₄CL – 0,85%), os esplenócitos foram semeados numa concentração de 10⁷ células/ml em DMEM (SIGMA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SIGMA, EUA), em placa de cultivo celular com 96 cavidades. Após 24 horas de incubação a 37 °C em ambiente com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e as células estimuladas em quadruplicata com DMEM (controle negativo), 0.1 MOI (multiplicidade de infecção) de CPV, 0.1 MOI de CCoV ou 5 μ g/mL de Concanavalina A (controle positivo). Quarenta e oito horas após a estimulação, as células foram congeladas em Trizol (Invitrogen), para extração de RNA total, de acordo com protocolo do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com 5 μ g de RNA total em uma reação de 25 μ l, contendo 0,5 μ l (150 ng) de random primers (Invitrogen), 1 μ l de trifosfato de desoxynucleosídeo (dNTP – 10 mM), “first strand buffer” 1x (Invitrogen), 0.1 M DTT, 40 U de RNaseOUT (Invitrogen) e 50 U da enzima transcriptase reversa M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs), segundo metodologia previamente descrita por Ulett et al. [19]. As amostras foram, então, incubadas a 25° C por 10 minutos, seguido de 42° C durante 50 minutos e 70° C por 15 minutos, em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. O cDNA resultante foi armazenado a -20°C. As reações de PCR foram executadas com 2 μ l de cDNA, 200 μ M de dNTPs, tampão da enzima Taq 1x, 1.5 U da enzima Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec), 1 μ M de cada primer, MgCl₂ (1.5 mM), além de água livre de RNase (Gibco-BRL), em um volume final de 25 μ l. Os parâmetros usados para a PCR foram os seguintes: 95° C por dois minutos, seguidos de 30 ciclos de 94° C durante 50 segundos, 60° C por 50 segundos e 72° C por um minuto, com extensão final de 72° C por sete minutos. Os primers utilizados (Ulett et al, 2000) foram sintetizados por MWG-Biotech Inc. (USA): IFN- γ “forward” 5’-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG; IFN- γ “reverse” 5’-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG; β -actina “forward” 5’- TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAAC; β -actina “reverse” 5’- TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG. Reações de PCR usando primers para β -actina, bem como reações sem cDNA foram realizadas como controle. Os produtos da PCR foram visualizados sob luz ultra-violeta, após eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. A avaliação da expressão de mRNA para INF- γ e β -actina foi realizada mediante a comparação visual entre as intensidades das bandas obtidas.

Análise Estatística

Os títulos de anticorpos foram comparados usando análise de variância (ANOVA). O teste LSD foi realizado para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada tratamento, usando programa Statistix.

RESULTADOS

ELISA

A média e o desvio padrão dos níveis de anticorpos (expressos em absorbância) contra o CPV, dos tratamentos na presença ou ausência de própolis, estão representados na Figura 1. Conforme se pode constatar, a própolis verde apresentou efeito adjuvante significativo ($p < 0,05$) apenas no grupo inoculado com a maior concentração de antígenos ($3,0 \times 10^6$ TCDI₅₀). Enquanto todos os tratamentos com própolis marrom apresentaram efeito adjuvante significativo ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos apenas com a vacina comercial, uma vez que houve aumento nos títulos de anticorpos, expressos em absorbância. No entanto, é importante ressaltar que na concentração de $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ o seu efeito imunoestimulante foi mais pronunciado. Esses dados sugerem atividade imunoestimulante da própolis verde e marrom, sendo que para a própolis verde este efeito foi dependente do título do antígeno utilizado. Além disso, indicam melhor desempenho da amostra marrom em relação à verde na estimulação da resposta humoral contra o CPV. Conforme esperado, nos grupos controle (1, 2 e 3) não houve estímulo à produção de anticorpos (dados não mostrados).

Na Figura 2 estão representadas as médias \pm desvio padrão do título de anticorpos (expressos em absorbância) contra CCoV, 21 dias após a inoculação dos antígenos na presença ou ausência de própolis. A utilização de própolis verde não demonstrou efeito imunoestimulante da resposta humoral para CCoV, em comparação aos demais tratamentos. Novamente pode-se observar efeito adjuvante significativo da própolis marrom em relação aos grupos que receberam somente a vacina comercial, nas concentrações de $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ e $3,0 \times 10^6$ TCDI₅₀. Este efeito foi diretamente proporcional à dose dos antígenos. No entanto, nos grupos tratados com $0,75 \times 10^6$ TCDI₅₀ dos antígenos co-administrados com própolis verde ou marrom, o antígeno, administrado isoladamente, demonstrou-se superior ($p < 0,05$). Novamente, nos grupos controle negativos (1, 2 e 3), não foi observado estímulo à produção de anticorpos (dados não mostrados).

RT-PCR

A Figura 3 representa a expressão de mRNA para INF- γ , quarenta e oito horas após estímulo com 0,1 MOI de CPV. As comparações foram estabelecidas entre grupos que receberam as mesmas concentrações de antígenos, na presença ou ausência de própolis. Conforme se pode observar, nos animais inoculados com vacina acrescida de própolis verde (amostras 3, 6 e 9), bem como naqueles que receberam 1.5×10^6 TCDI₅₀ de vacina associada a própolis marrom (amostra 7), a expressão de mRNA para INF- γ não foi superior aos tratamentos controle (2, 5 e 8). Em relação à amostra marrom, houve incremento na expressão de mRNA para INF- γ nos grupos inoculados com vacina nas concentrações de 0,75 e $3,0 \times 10^6$ TCDI₅₀ associada a própolis marrom (amostras 4 e 10) quando comparados aos tratamentos apenas com vacina comercial nas mesmas concentrações (amostras 2 e 8). Esses dados sugerem que o efeito imunoestimulante da própolis marrom sobre a resposta imune celular para CPV foi dependente da concentração do antígeno utilizado. A expressão de mRNA para β -actina não variou nos diferentes tratamentos (dados não mostrados), indicando estímulo específico na produção de INF- γ .

A Figura 4 representa os produtos de RT-PCR para INF- γ , quarenta e oito horas após estímulo com 0,1 MOI de CCoV. As comparações foram estabelecidas entre grupos que receberam as mesmas concentrações de antígenos (vacina) na presença ou ausência de própolis. Com base na análise da Figura 4, pode-se constatar que a própolis verde apresentou atividade imunoestimulante da resposta imune celular nos animais inoculados com extrato etanólico associado a 0,75 e $1,5 \times 10^6$ TCID₅₀ dos antígenos (amostras 3 e 6) em comparação com aqueles vacinados com as mesmas doses dos antígenos, porém sem própolis (amostras 2 e 5). Já própolis marrom exerceu influência sobre o grupo inoculado com $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀ de antígenos co-administrados com seu extrato aquoso (amostra 10), através de maior expressão de mRNA para INF- γ quando comparado ao grupo que recebeu a mesma dose de vacina, na ausência de própolis (amostra 8). Portanto, nessa concentração de antígenos a própolis marrom demonstrou capacidade adjuvante, estimulando a resposta imune celular. Os demais tratamentos com própolis marrom (amostras 4 e 7) e um tratamento com a própolis verde (amostra 9) não diferiram de seus respectivos controles positivos, grupos inoculados somente com vacina (amostras 2, 5 e 8).

DISCUSSÃO

As vacinas com antígenos múltiplos têm representado um grande avanço na imunização de animais de companhia e de produção, já que aliam economias de tempo, custo e manejo, diminuindo o estresse. No entanto, a eficiência dessas vacinas tem sido, por vezes, questionada [20] e a escolha de um adjuvante adequado pode significar um melhor desempenho destas vacinas em imunizações múltiplas. Apesar de não existir um adjuvante

universal, que estimule o sistema imune de forma eficiente contra diversos antígenos, existem muitas escolhas em potencial [21]. Nesse contexto, a própolis surge como uma alternativa em potencial, uma vez que diversas pesquisas vêm demonstrando suas atividades estimulantes sobre o sistema imune humoral [11, 12, 22, 23] e celular [11, 12]. A maioria das vacinas utiliza adjuvantes clássicos, como sais de alumínio e emulsões oleosas, que funcionam como adjuvantes de depósito promovendo a liberação lenta do antígeno e estimulando, dessa forma, o sistema imune por um período mais prolongado [24]. Contudo, muitas vacinas, como as atenuadas, não necessitam desse sistema de entrega, já que os antígenos permanecem com capacidade de replicação no organismo hospedeiro. Isso não significa que essas vacinas não necessitem de substâncias que possam auxiliá-las no estímulo a uma resposta imune mais eficiente. Em se tratando da associação de vários antígenos atenuados, muitas vezes é difícil o uso de altas doses vacinais, o que poderia acarretar em um volume muito grande a ser inoculado. Além disso, estas associações podem ter como consequência a competição entre antígenos [25], uma vez que podem possuir características antigênicas distintas. O encontro de um adjuvante adequado a essas vacinas poderá potencializar a resposta imune, na ausência de possíveis efeitos colaterais.

Nesse estudo, camundongos foram inoculados com diferentes doses de uma vacina comercial com antígenos múltiplos, usada para imunizar caninos, associada ou não a extratos etanólico de própolis verde ou aquoso de própolis marrom. O efeito adjuvante da própolis foi analisado em relação ao CPV atenuado e ao CCoV inativado. A adição de 400 µg/dose de extrato etanólico de própolis verde estimulou de forma significativa ($p < 0,05$) à produção de anticorpos anti-CPV no grupo de animais inoculados com a maior concentração dos antígenos, em comparação ao grupo inoculado com a mesma dose da vacina, porém sem própolis. Embora a própolis verde tenha apresentado atividade estimulante significativa em apenas um grupo, a tendência foi de aumento nos níveis de anticorpos com o aumento da dose do antígeno, contribuindo, assim, para minimizar uma possível atividade imunossupressora da vacina. Com relação à própolis marrom, a adição do extrato aquoso aos antígenos comerciais incrementou significativamente ($p < 0,05$) a resposta imune humoral contra o CPV em todos os grupos, quando comparados aos seus respectivos controles positivos (grupos que receberam diferentes concentrações da vacina, sem própolis). O efeito adjuvante mais pronunciado foi verificado no grupo inoculado com a dose intermediária da vacina. Algumas pesquisas apontam o CPV como um antígeno imunossupressor, podendo causar falhas vacinais [25], enquanto que outras sugerem que as interações entre os vírus atenuados possam ser potencialmente imunossupressoras [26]. Apesar de não haver diferença estatística, os dados obtidos neste experimento sugerem que a menor dose da vacina sem própolis estimulou maior produção de anticorpos anti-CPV e as doses intermediária e alta induziram uma resposta menor e equivalente. Esses

resultados podem refletir um possível efeito imunossupressor deste antígeno, pois à medida que a sua dose aumentou, a absorvência diminuiu. No entanto, o efeito adjuvante da própolis se manteve e foi nitidamente maior no grupo intermediário (Figura 1). Nesse caso em especial, a atividade imunoestimulante da própolis pode sobrepor-se a um possível efeito imunossupressor indesejável da vacina e evitar uma falha vacinal. Esses resultados demonstram estimulação da resposta imune humoral contra o CPV e somam-se a outros experimentos que atribuíram propriedade imunoestimulante a própolis. Sforcin et al. [27] avaliaram a ação de extratos etanólicos de própolis brasileira e búlgara sobre a produção de anticorpos e concluíram que ambas as amostras estimularam aumento na produção de anticorpos em ratos inoculados com soro albumina bovina.

Com relação ao CCoV, a mensuração dos anticorpos revelou aumento significativo ($p < 0,05$) da resposta imune humoral nos animais inoculados com $1,5$ e $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀ dos antígenos co-administrados com extrato aquoso de própolis marrom, quando comparados aos seus respectivos controles positivos. Cabe ressaltar que esse antígeno estava inativado e adsorvido ao hidróxido de alumínio. Esses resultados sugerem atividade imunoestimulante da própolis marrom em vacina inativada, corroborando com resultados obtidos por outros pesquisadores como Chu [23], que demonstrou propriedade adjuvante da própolis quando associada a uma vacina inativada contra *Aeromonas hydrophila* em carpas, através do aumento no título de anticorpos e elevação na taxa de sobrevivência ao desafio. Nosso grupo também já havia demonstrado a atividade imunoestimulante sobre a resposta imune humoral através da co-administração de extratos etanólicos de própolis verde com vacinas inativadas monovalentes. A associação de 40 mg/dose de extrato etanólico de própolis verde com uma vacina oleosa contra herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) resultou em incremento significativo ($p < 0,01$) nos níveis de anticorpos neutralizantes, quando comparados à mesma vacina sem própolis [11]. No presente estudo, no entanto, a própolis verde não demonstrou atividade adjuvante da resposta humoral quando co-administrada com CCoV inativado e adsorvido ao hidróxido de alumínio (Figura 2). Resultado diferente foi observado em relação ao herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), quando extratos etanólicos de própolis verde foram adicionados à vacina contendo hidróxido de alumínio, detectando-se aumento significativo nos níveis de anticorpos [12]. É possível que o extrato etanólico da própolis verde não tenha atividade estimulante contra o CCoV ou que a forma como foi usado não tenha permitido a manifestação dessa ação. Essas diferenças encontradas entre as amostras de própolis, tanto em relação ao CPV como ao CCoV, podem estar relacionadas a origens botânicas diferentes (já que foram utilizadas amostras distintas), a forma como foram obtidos os extratos, ou ainda ao protocolo de administração empregado. A origem botânica está ligada a variabilidade química das amostras, o que, muitas

vezes, confere à própolis atividades biológicas diferenciadas, dependendo da região da coleta [3, 28]. Além disso, a adoção de metodologias distintas contribui para a obtenção de resultados variados [29].

O exato mecanismo de ação da própolis sobre o sistema imunológico permanece desconhecido devido à grande complexidade e diversidade de constituintes, o que leva muitas pesquisas a apresentarem resultados controversos [29]. Dentre essa diversidade de componentes destacam-se os polifenóis [1, 30], aos quais são atribuída atividade de incremento na proliferação de linfócitos [31]. Além disso, a estimulação de macrófagos à produção de citocinas capazes de amplificar a resposta imune humoral pode ser um mecanismo de ação envolvido [32]. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) indicam que a própolis marrom possui em sua constituição uma maior concentração de compostos fenólicos, quando comparada a própolis verde (Fischer, 2009, comunicação pessoal). Isso poderia explicar a maior atividade imunoestimulante observada nesse estudo com o uso da própolis marrom.

Outro parâmetro analisado nesse experimento foi a expressão de mRNA para INF- γ , pela técnica de RT-PCR, para avaliar a influência da própolis sobre a resposta imune celular. Com relação ao CPV, foi possível constatar que a própolis verde não incrementou a expressão de mRNA para INF- γ de CPV em nenhum tratamento, quando comparada aos controles positivos. Uma possível explicação para esses resultados pode ser obtida ao se analisar os dados obtidos por Strasser [20], que concluíram que a administração de vacinas múltiplas em caninos promove uma troca transitória no balanço entre a imunidade humoral e celular. Esses autores observaram incremento na resposta humoral (aumento dos níveis séricos de IgG) associado ao decréscimo na resposta celular (diminuições significativas na atividade mitógena de células T em resposta a fitohemaglutinina (PHA), função de neutrófilos e concentração sérica de neopterinina). Por outro lado, própolis marrom estimulou a resposta celular nos animais inoculados com 0,75 e $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀ dos antígenos. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Fischer et al. (2007b), que demonstraram que a associação de própolis com SuHV-1 estimulou a produção de INF- γ . No entanto, é interessante notar que 400 μ g/dose de extrato aquoso de própolis marrom co-administrado com $1,5 \times 10^6$ TCID₅₀ da vacina estimularam de forma significativa a resposta humoral, destacando-se dos demais tratamentos, mas não estimularam a resposta celular.

O RT-PCR avaliando a expressão de mRNA para INF- γ específico para CCoV revelou propriedade adjuvante da própolis verde nas concentrações de 0,75 e $3,0 \times 10^6$ TCID₅₀ dos antígenos e da própolis marrom na dose de vacina de 3×10^6 TCID₅₀. Portanto, nessas condições, as amostras de própolis utilizadas estimularam a resposta celular contra o CCoV inativado e adsorvido ao hidróxido de alumínio, corroborando com os dados

obtidos por Fischer et al. [12], que comprovaram atividade estimulante do extrato etanólico de própolis verde associado a SuHV-1 inativado e SuHV-1 inativado e na presença do hidróxido de alumínio.

Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram que o extrato etanólico de própolis verde incrementou a resposta humoral contra o CPV e a celular contra o CCoV, evidenciando a sua atividade imunomoduladora. Enquanto o extrato aquoso de própolis marrom apresentou atividade adjuvante sobre as respostas imunes humoral e celular, contra o CPV atenuado e o CCoV inativado, quando incorporado a uma vacina múltipla. Nosso grupo está realizando outras pesquisas para avaliar a ação da própolis em relação aos demais antígenos presentes na formulação da vacina múltipla utilizada. Após essas avaliações, novos estudos deverão ser realizados em caninos. O uso da própolis pode contribuir para a eficácia de vacinas múltiplas devido à atividade estimulante tanto sobre a resposta imune humoral como celular, justificando mais pesquisas nessa área.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro. G. Fischer é bolsista do programa de Pós-Doutorado Júnior do CNPq; Nectar Farmacêutica Ltda., Belo Horizonte, MG – Brasil, pelo fornecimento da própolis verde.

REFERÊNCIAS

- [1] Castaldo S, Capasso F. Propolis: an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002; 1: S1-S6.
- [2] Park YK, Alencar SM, Scamparini ARP, Aguiar CL. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural* 2002; 32(6): 997-1003.
- [3] Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
- [4] Fischer G, Dummer LA, Vidor T, Paulino N, Paulino AS. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. *Proceedings of the 7th Encontro de pós-graduação*, 2005; Pelotas, Brasil.
- [5] Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals Toxins* 2000; 6(2): 205-19.
- [6] Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Pat Med Lab* 2003; 39(4): 343-50.

- [7] Orsolich N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol* 2004; 94: 307-15.
- [8] Song YS, Park EH, Hur GM, Ryu YS, Kim YM, Jin C. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *J Ethnopharmacol* 2002; 80: 155-61.
- [9] Hu F, Hepburn HR, Yinghua L, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 276-83.
- [10] Sy LB, Wu YL, Chiang BL, Wang YH, Wu WM. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1053-60.
- [11] Fischer G, Cleff MB, Dummer LA, Paulino N, Paulino AS, Vilela CO. et al. Adjuvant effect of green própolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116: 79-84.
- [12] Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Dummer LA, Vargas GD, Hübner SO et al. Immunomodulation produced by green própolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 2007; 25: 1250-56.
- [13] Paulino N, Scremin FM, Raichaski LB, Marcucci MC, Scremin A, Calixto JB. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea in vitro. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:1-9.
- [14] AAALAC, COBEA 2003. Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório – edição em português [cited 2007 Aug 24]. Available from: <http://www.nap.edu/catalog/11441.html>.
- [15] Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 714, de 20 de JUNHO de 2002. Provides for procedures and methods of euthanasia on animals [cited 2007 Jun 15]. Available from: http://www.furb.br/2005/arquivos/357080-486559/Resolucao%20714_%202002.htm .
- [16] Voller A. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *Ric Clin Lab* 1978; 8(4): 289-98.
- [17] 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* 2002; 102: 67-71.
- [18] Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG, Doster AR, Nelson E, Osorio FA. Construction and immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2002; 21: 21-9.

- [19] Ulett GC, Ketheesan N, Hirst RG. Cytokine gene expression in innately susceptible Balb/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 2000; 68(4): 2034-42.
- [20] Strasser A, May B, Teltscher A, Wistrela E, Niedermuller H. Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 94: 113-21.
- [21] Heldens JGM, Patel JR, Chante N, ten Thij GJ, Gravendijck M, Schijns VEJC, et al. Veterinary vaccine development from an industrial perspective. *The Vet J* 2008; 178: 7-20.
- [22] Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J Ethnopharmacol* 2005; 98: 301-5.
- [23] Chu WH. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Shellfish Immunol* 2006; 21: 113-7.
- [24] Aguilar JC, Rodríguez EC. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 2007; 25: 3752-62.
- [25] Krakowka S, Olsen RG, Axthelm MK, Rice J, Winters K. Canine Parvovirus infection potentiates canine distemper encephalitis attributable to modified-live-virus vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 137-9.
- [26] Phillips TR, Jensen JL, Rubino MJ, Yang WC, Schultz RD. Effects of vaccines on the canine immune system. *Can J Vet Res* 1989; 53: 154-60.
- [27] Sforcin JM. Propolis and immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 1-14.
- [28] Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 114-7.
- [29] Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T. Imunomodulação pela própolis. *Arq Inst Biol* 2008; 75(2): 247-253.
- [30] De Castro SL. Propolis: Biological and Pharmacological Activities. *Ann Ver Biomed Sci* 2001; 3: 49-83.
- [31] Ivanovska N, Neychev H, Stefanova Z, Bankova V, Popov S. Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation, cytokine release and *Klebsiella* infection in mice. *Apidologie* 1995; 26: 73-81.
- [32] Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Z Naturforsch* 2003; 58c: 580-9.

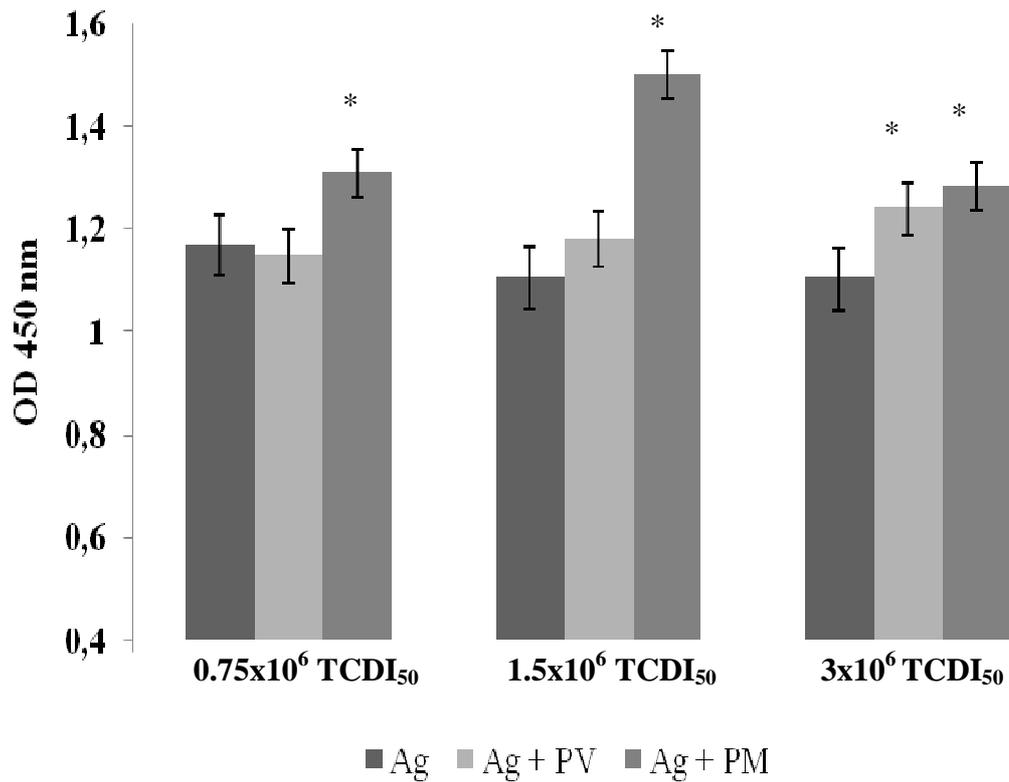


Figura 1: Média \pm desvio padrão da absorbância da resposta imune humoral anti-CPV, em soros de camundongos, na diluição 1:50, determinados por ELISA, 21 dias após a terceira inoculação. Comparação estabelecida entre grupos que receberam a mesma concentração de antígenos, com e sem própolis. Ag: antígenos; Ag + PV: antígenos co-administrados com 400 μ g/dose de própolis verde; Ag + PM: antígenos co-administrados com 400 μ g/dose de própolis marrom. TCDI₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares / 25 μ l). (n=10) * p<0,05

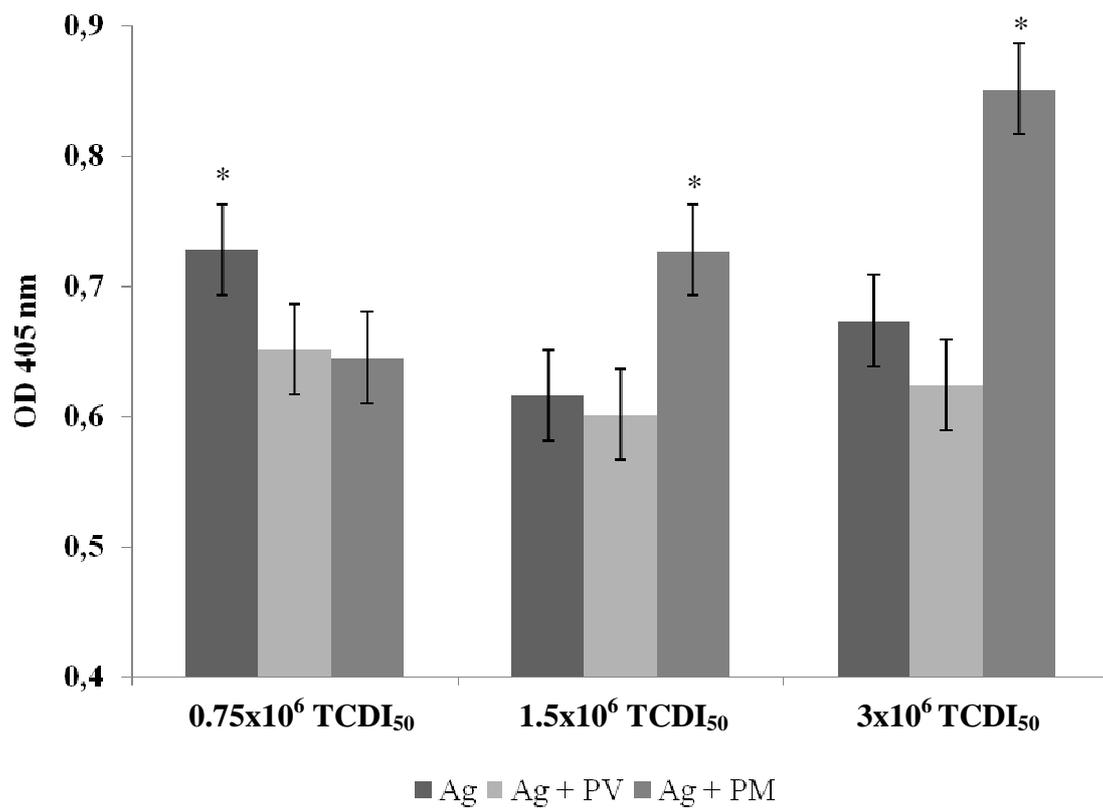


Figura 2: Média \pm desvio padrão da absorbância para CCoV dos soros dos camundongos, na diluição 1:50, determinados por ELISA, 21 dias após a terceira inoculação. Comparação estabelecida entre grupos que receberam a mesma concentração de antígenos com e sem própolis. Ag: antígenos; Ag + PV: antígenos co-administrados com própolis verde; Ag + PM: antígenos co-administrados com própolis marrom. TCDI₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares / 25 μ l). (n=10) * p<0,05

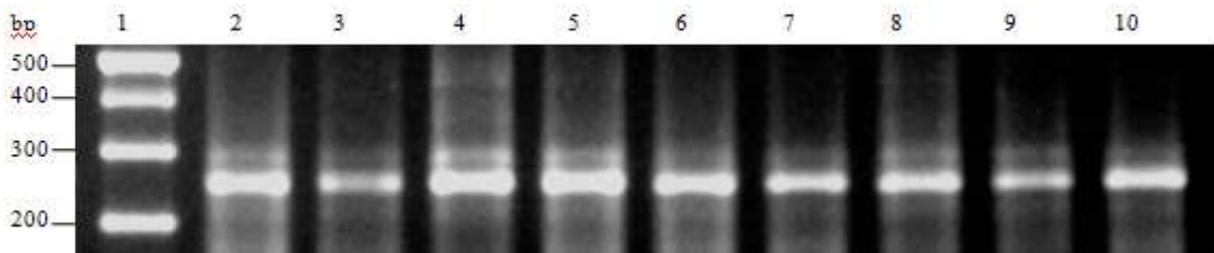


Figura 3: Produtos de RT-PCR em gel de agarose resultantes da amplificação de mRNA para IFN- γ de esplenócitos de camundongos coletados 30 dias após a terceira inoculação de vacina com ou sem própolis. Quarenta e oito horas após estimulação com 0,1 MOI de CPV: INF- γ – 1, GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Invitrogen); 2, $0,75 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina; 3, $0,75 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis verde; 4, $0,75 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis marrom; 5, $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina; 6, $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis verde; 7, $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis marrom; 8, 3×10^6 TCDI₅₀ de vacina; 9, 3×10^6 TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis verde; 10, 3×10^6 TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis marrom.

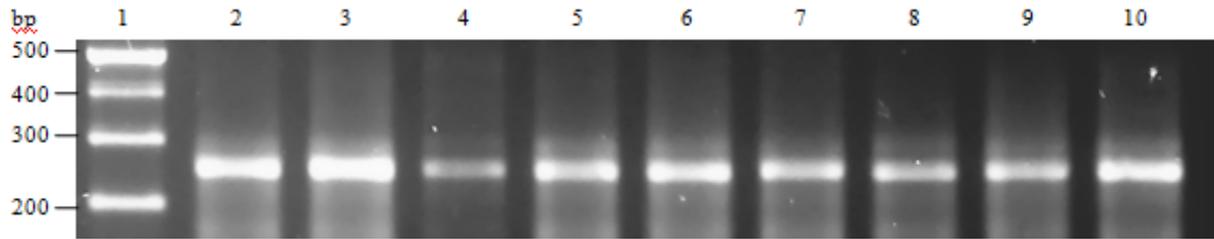


Figura 4: Produtos de RT-PCR em gel de agarose resultantes da amplificação de mRNA para IFN- γ de esplenócitos de camundongos coletados 30 dias após a terceira inoculação de vacina com ou sem própolis. Quarenta e oito horas após estimulação com 0,1 MOI de CCoV: INF- γ – 1, GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Invitrogen); 2, $0,75 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina; 3, $0,75 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis verde; 4, $0,75 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis marrom; 5, $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina; 6, $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis verde; 7, $1,5 \times 10^6$ TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis marrom; 8, 3×10^6 TCDI₅₀ de vacina; 9, 3×10^6 TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis verde; 10, 3×10^6 TCDI₅₀ de vacina mais 400 μ g de própolis marrom.

5 CONCLUSÕES

- Os extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom atuaram como moduladores do sistema imunológico.

- A associação de extrato etanólico de própolis verde a uma vacina múltipla incrementou a resposta humoral contra o CPV atenuado e a celular contra o CCoV inativado.

- A associação de extrato aquoso de própolis marrom com uma vacina múltipla propiciou incremento nas respostas imunes humoral e celular de camundongos contra o CPV atenuado e o CCoV inativado.

- Os extratos de própolis verde e marrom utilizados nesse experimento podem contribuir para a eficácia de vacinas múltiplas devido à atividade adjuvante sobre as respostas imunes humoral e celular.

6 REFERÊNCIAS

AGUILAR, J.C., RODRÍGUEZ, E.C. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, v.25, p.3752-3762, 2007.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BAZIN, H. A brief history of the prevention of infectious diseases by immunizations. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.26, p.293-308, 2003.

DE CASTRO, S.L. Própolis: Biological and Pharmacological Activities. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v.3, p.49-83, 2001.

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: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 7, 2005, Pelotas, RS. **Anais**. Pelotas, 2005.

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.250-1256, 2007b.

FISCHER, G., HÜBNER, S.O., VARGAS, G.D., VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.75, n.2, p.247-253, 2008.

HASS, R., JOHANN, J.M., CAETANO, C.F., FISCHER, G., VARGAS, G.D., VIDOR, T., HÜBNER, S.O. Níveis de anticorpos contra o vírus da cinomose canina e o

parvovírus canino em cães não vacinados e vacinados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.270-274, 2008.

HU, F., HEPBURN, H.R., YINGHUA, L., CHEN, M., RADLOFF, S.E., DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.276-283, 2005.

KRAKOWKA, S., OLSEN, R.G., AXTHELM, M.K., RICE, J., WINTERS, K. Canine Parvovirus infection potentiates canine distemper encephalitis attributable to modified-live-virus vaccine. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.180, p.137-139, 1982.

MARCUCCI, M.C. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. **Química Nova**, n.19, p.529-536, 1996.

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, n.2, p.205-219, 2000.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, n.2, p.321-326, 2002.

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.

SONG, Y.S., PARK, E.H., HUR, G.M., RYU, Y.S., KIM, Y.M., JIN, C. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.155-161, 2002.

STRASSER, A., MAY, B., TELTSCHER, A., WISTRELA, E., NIEDERMULLER, H. Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.94, p.113-121, 2003.

SY, L.B., WU, Y.L., CHIANG, B.L., WANG, Y.H., WU, W.M. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. **International Immunopharmacology**, v.6, p.1053-1060, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)