

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Agrícola



Tese

**Avaliação da Capacidade Imunomoduladora de Extratos de
Própolis Verde em Animais Vacinados com
Herpesvírus Suíno Tipo 1 (SuHV-1) ou
Herpesvírus Bovino Tipo 5 (BoHV-5)**

Geferson Fischer

Pelotas, 2007

GEFERSON FISCHER

Avaliação da Capacidade Imunomoduladora de Extratos de
Própolis Verde em Animais Vacinados com Herpesvírus Suí no
Tipo 1 (SuHV-1) ou Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Telmo Vidor, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Telmo Vidor

Co-Orientador: Prof. Dr. Niraldo Paulino

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F529a Fischer, Geferson

Avaliação da capacidade imunomoduladora de extratos de própolis verde em animais vacinados com herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) ou herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) / Geferson Fischer ; orientador Telmo Vidor ; co-orientador Niraldo Paulino. – Pelotas, 2007. – 76f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

1.Biotecnologia. 2.Própolis. 3.Sistema imunológico.
4.Imunomodulação. 5.Adjuvante. I.Vidor, Telmo. II.Paulino, Niraldo. III.Título.

CDD: 6136.4089

Banca examinadora:

Prof. Dr. Telmo Vidor (orientador)

Prof. Dr. Niraldo Paulino (co-orientador)

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Centro de Biotecnologia/UFPel)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Instituto de Biologia/Departamento de Microbiologia e Parasitologia/UFPel)

*À Chris, minha estrela guia,
e minha mãe Vera.
Em memória do meu amado
pai e da amiga Vivi.*

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, razão de tudo, por mais uma etapa vencida. Quando poucos acreditavam, foi minha fonte de força, esperança.

À minha esposa Chris, que tornou a minha caminhada mais bela e significativa, cujo amor, paixão e incentivo foram imprescindíveis.

À minha mãe Vera, pelo amor e carinho que a mim dedicou, pelo apoio e incentivo.

Ao meu pai Joaquim. Infelizmente não pudeste presenciar o término desta etapa. Mas foi o teu exemplo de vida que me norteou. Agora, como um anjo de Deus, certamente continuarás nos amparando!

Ao professor Telmo Vidor. Mais do que orientador, foi amigo, exemplo de persistência.

Ao professor Niraldo Paulino, meu co-orientador, e sua esposa, professora Amarílis. Nossa parceria tornou este projeto possível. O entusiasmo de vocês com a própolis me incentivou, deu forças.

Ao amigo José Carlos Rösler Sandrini, cuja paciência e presença constante foram fundamentais. Os momentos de descontração também foram indispensáveis.

À amiga Marlete Brumm Cleff, pela inestimável ajuda na execução deste trabalho. Pelo companheirismo e sempre achar que “a vida é bela”!

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária: Eliete Sandrini, Enilda Souza de Oliveira, Andréia Peixoto, Silvia de Oliveira Hübner, Gilberto D’Avila Vargas, Caren Quincozes, Camila Vilela, Luana Alves Dummer, Tiago Storch, Fabrício Campos, pelo apoio sempre que necessário, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia, em especial ao Fabricio Rochedo Conceição.

Aos professores Odir Antônio Dellagostin e Fábio Pereira Leivas Leite, pelo apoio e incansável contribuição.

Ao professor José Vasconcelos Arnoni, pelo fornecimento dos bovinos.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realização deste curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento de parte das pesquisas.

A todos os amigos não citados, mas que sabem que de alguma forma são fundamentais na minha vida.

Por fim, agradeço a todos que colaboraram de alguma forma na execução deste trabalho.

***“... porque são os passos
que fazem os caminhos...”***

Mário Quintana

e

***“porque o desejo, como a
esperança, são dois ventos
necessários para a viagem
da vida.”***

Campoamor

RESUMO

FISCHER, Geferson. **Avaliação da Capacidade Imunomoduladora de Extratos de Própolis Verde em Animais Vacinados com Herpesvírus Suíno Tipo 1 (SuHV-1) ou Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5)**. 2007. 76f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Orientador: Telmo Vidor. Co-orientador: Niraldo Paulino.

A formulação de vacinas frequentemente requer o uso de adjuvantes que prolongam ou potencializam as respostas imunes humoral e/ou celular. Atualmente, muitas vacinas são formuladas a partir de substâncias como o hidróxido de alumínio ou emulsões oleosas, específicas para uso veterinário. Contudo, tem sido crescente o interesse pela avaliação de substâncias naturais com potencial adjuvante, como os extratos derivados de plantas. A própolis, produzida pelas abelhas a partir de exsudatos coletados de plantas, tem despertado o interesse de pesquisadores em função das inúmeras propriedades bioativas relatadas, como ação antiviral, antiinflamatória e antitumoral. Além disso, apesar de desconhecidos muitos dos mecanismos de ação, a própolis apresenta atividade sobre o sistema imune. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade imunomoduladora de um extrato etanólico da própolis verde brasileira, quando utilizado como adjuvante em vacinas inativadas contra o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) ou herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5). A adição de 5 mg/dose do extrato a uma vacina com hidróxido de alumínio contra o SuHV-1 incrementou a resposta imune humoral de camundongos, quando comparado com a mesma vacina sem própolis ($P < 0,01$). Este efeito foi mais evidente quando a vacina foi diluída (1:4 e 1:8), podendo-se observar um aumento no título de anticorpos neutralizantes, expresso em $\log_2$, que passou de 3 para 4,48 e de 2,18 para 4,48, respectivamente, sugerindo que quanto menor a massa antigênica ou menos imunogênico o antígeno, mais pronunciado é o efeito adjuvante da própolis. Quando a própolis foi utilizada isoladamente com o antígeno, não foi observado aumento no título de anticorpos neutralizantes, determinado por soroneutralização. Além de incrementar a resposta imune humoral, o uso da própolis também aumentou a resposta celular, elevando a síntese de mRNA de IFN- γ nos esplenócitos dos camundongos, mensurada pela técnica de RT-PCR. Este aumento foi observado inclusive no grupo de animais imunizados somente com antígeno e própolis, contrariando os resultados da resposta humoral. O efeito adjuvante da própolis foi evidenciado também quando camundongos foram desafiados com 31,6 doses letais do SuHV-1, 21 após a segunda inoculação. A adição da própolis à vacina com hidróxido de alumínio aumentou o percentual de animais protegidos, especialmente nas maiores diluições, em comparação à vacina sem própolis. Resultado semelhante foi observado no grupo de animais vacinados somente com própolis e antígeno. A associação de 40 mg/dose do extrato etanólico de própolis verde à vacina oleosa contra BoHV-5 aumentou o título de anticorpos neutralizantes de bovinos ($P < 0,01$), quando comparado à vacina sem própolis. Trinta dias após a

segunda vacinação, o título passou de 35 para 54 e aumentou de 43 para 67, trinta dias após a terceira vacinação. Além disso, houve aumento no percentual de animais com títulos elevados, acima de 32. A inclusão de 20 mg/dose do extrato não alterou a resposta humoral. A análise cromatográfica da própolis por HPLC revelou altos níveis de compostos fenólicos como o artepillin C e derivados do ácido cinâmico, que podem ter sido as principais substâncias com ação sobre o sistema imunológico. Portanto, o extrato etanólico de própolis verde atuou como uma substância adjuvante, incrementando as respostas imunes humoral e celular em camundongos e humoral em bovinos, melhorando a eficiência das vacinas experimentais.

Palavras-chave: própolis, sistema imunológico, imunomodulação, adjuvante

ABSTRACT

FISCHER, Geferson. **Evaluation of the immunomodulator activity of green propolis extract in animals vaccinated with swine herpesvirus type 1 (SuHV-1) or bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5)**. 2007. 76f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Adviser: Telmo Vidor. Co-adviser: Nivaldo Paulino.

Vaccine formulation often requires the use of adjuvants which enhance or potentiate humoral and/or cellular responses. Nowadays, many vaccines are formulated with substances such as aluminum hydroxide or oily emulsions, specific for veterinary use. However, the interest on the evaluation of natural substances with adjuvant potential like plant extracts has grown. Propolis produced by honey bees from exudates collected from plants has call the attention of researchers due to several bioactive properties reported, such as antiviral, antiinflammatory and antitumoral action. In addition, although the mechanism of action remains unknown, propolis presents activity on the immune system. The aim of this study was to evaluate the immunomodulator activity of an ethanolic extract of Brazilian green propolis, when used as adjuvant in inactivated vaccines against swine herpesvirus type 1 (SuHV-1) or bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5). The addition of 5 mg/dose of the extract to a vaccine with aluminum hydroxide against SuHV-1 increased the humoral immune response of mice, when compared to the same vaccine without propolis ($P<0,01$). This effect was more evident when the vaccine was diluted (1:4 and 1:8). The raise in neutralizing antibodies titer, expressed in $\log_2$, went from 3 to 4.48 and 2.18 to 4.48, respectively, suggesting that the smaller the antigenic mass or less immunogenic the antigen, more pronounced is the adjuvant effect of propolis. When propolis was used on its own with the antigen, an increase in the titer of neutralizing antibodies determined by seroneutralization was not observed. Besides increasing the humoral immune response, the use of propolis also increased the cellular response, increasing mRNA synthesis of IFN- γ in mice splenocytes, measured by RT-PCR. This increase was also observed in the group of animals immunized only with antigen and propolis, unlike the effect observed on the humoral response. The adjuvant effect of propolis was also demonstrated when mice were challenged with 31.6 lethal doses of SuHV-1, 21 days after the second inoculation. The addition of propolis to the vaccine with aluminum hydroxide increased the percentage of protected animals, especially in the higher dilutions, comparing to the vaccine without propolis. Similar result was observed in the group of animals vaccinated only with propolis and antigen. The association of 40 mg/dose of ethanolic extract of green propolis to the oily vaccine against BoHV-5 increased titer of bovine neutralizing antibodies ($P<0,01$), when compared to a vaccine without propolis. Thirty days after the second dose the titer went from 35 to 54, and after the third dose it increased from 43 to 67. In addition, there was an increase in the percentage of animals with titer above 32. The inclusion of 20 mg/dose of the extract did not alter the humoral response. The

chromatographic analysis of propolis by HPLC showed high levels of phenolic compounds as artepillin C and cynamic acid derived, which may be the main substances with action on the immunologic system. Therefore, green propolis ethanolic extract acted as an adjuvant substance, increasing humoral and cellular immune responses in mice and humoral response in bovines, improving the efficiency of experimental vaccines.

Key-words: propolis, immunological system, immunomodulation, adjuvant.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 ARTIGO 1	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	8
IMUNOMODULAÇÃO	10
PRÓPOLIS E IMUNOESTIMULAÇÃO	11
PRÓPOLIS E IMUNOSSUPRESSÃO	15
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	19
3 ARTIGO 2	29
Summary	30
1. Introduction	31
2. Material and methods	32
2.1 Ethanolic extract of green propolis	32
2.2 Vaccine preparations and inoculations	33
2.3 Humoral immunity and protection.....	34
2.4 Cellular immunity	35
2.5 Statistical Analysis.....	37
3. Results	37
3.1 Humoral immunity	37
3.2 Protection afforded by the vaccine preparations	38
3.3 Cellular immunity	40
4. Discussion.....	41
Acknowledgements.....	45
References	46
4 ARTIGO 3	52
Abstract.....	53
1. Introduction	54
2. Material and methods	56
2.1. Preparation, botanical and chemical characterization of the propolis ethanolic extract	56
2.2. Vaccines and inoculations	56
2.3. Serology	57
2.4. Statistical analysis	58
3. Results	58

3.1. Chemical composition of the propolis extract	58
3.2. Humoral Response	59
4. Discussion.....	61
5. Conclusions	64
Acknowledgments	65
References	65
5 CONCLUSÕES	71
6 REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Ainda na idade média, quando o homem identificou a primeira doença infecciosa através de sua sintomatologia, rapidamente percebeu que o indivíduo acometido passava por um período subsequente de proteção contra a mesma enfermidade. Não raros eram os casos em que uma mesma pessoa não era acometida pela mesma enfermidade uma segunda vez. Baseado nestes fatos, a primeira forma de imunização consistia em transmitir determinada enfermidade de um indivíduo a outro, na tentativa de reduzir a sua gravidade e os índices de mortalidade. Assim, já no século XII, os chineses adotavam uma das primeiras práticas de imunização na tentativa de evitar a ocorrência de doenças, a variolação, que consistia na inalação de um pó preparado a partir da crosta da pústula da varíola, como forma de proteção contra qualquer futura infecção (BAZIN, 2003). Este processo reduzia o índice de mortalidade pela doença, porém para padrões inaceitáveis atualmente. Em 1796, ao inocular o material das lesões de varíola bovina em humanos, produzindo uma doença menos severa, Edward Jenner percebeu que esse processo reduzia os riscos decorrentes da variolação, definindo este processo como vacinação (do latim, *vacca*, vaca). Este termo ainda hoje descreve a inoculação de cepas atenuadas ou inativadas de agentes causadores de doenças em indivíduos sadios, a fim de obter proteção natural do organismo contra uma enfermidade.

As primeiras vacinações realizadas por Jenner e Pasteur nos séculos XVIII e XIX eram práticas totalmente empíricas e se confundiram com o surgimento da própria imunologia como ciência (BAZIN, 2003). Aliás, as descobertas relacionadas ao funcionamento do sistema imunológico foram fundamentais para o desenvolvimento da vacinologia (SCHATZMAYR, 2003). Desde então, houve uma grande evolução no desenvolvimento de vacinas. Além daquelas consideradas

tradicionais, compostas de patógenos vivos atenuados, de organismos inteiros inativados ou de toxinas bacterianas inativadas, várias novas abordagens têm sido propostas. Assim, surgiram as vacinas de subunidades, vacinas recombinantes e vacinas de DNA.

Este recente progresso no desenvolvimento de vacinas tem permitido a sua utilização não apenas de modo profilático, mas também no tratamento do câncer, desordens imunológicas e infecções crônicas (BLOM; HILGERS, 2004). Contudo, apesar do grande avanço tecnológico, muitas vacinas são pouco imunogênicas ou não conferem uma resposta imune capaz de prevenir a enfermidade, necessitando da associação com substâncias adjuvantes (SINGH; O'HAGAN, 2002).

O termo adjuvante (do latim, *adjuvare*, ajudar) foi primeiramente descrito na década de 1920 como uma “substância que, usada em combinação com um antígeno específico, produz mais imunidade que o antígeno sozinho” (SINGH; O'HAGAN, 1999). Desde então, muitos outros conceitos foram formulados. No entanto, parece correto afirmar que “cada molécula ou substância capaz de favorecer ou amplificar um passo na cascata de eventos imunológicos (STORNI et al., 2005), prolongando ou potencializando as respostas imunes humoral e/ou celular” (LECLERC, 2003), pode ser definida como um adjuvante.

De acordo com Singh e O'Hagan (2003) os adjuvantes podem ser usados para aperfeiçoar a resposta imune de vacinas de várias formas, incluindo: 1) aumentar a imunogenicidade de antígenos fracos; 2) aumentar a velocidade e a duração da resposta imune; 3) modular a atividade dos anticorpos a sua especificidade; 4) estimular os linfócitos T citotóxicos; 5) promover a indução de imunidade de mucosas; 6) aumentar a resposta imune em indivíduos imaturos imunologicamente ou senescentes; 7) diminuir a dose de antígeno nas vacinas, reduzindo os custos.

Embora várias substâncias tenham sido avaliadas quanto a sua capacidade adjuvante, muitas vezes demonstrando alta potência imunológica (SINGH; O'HAGAN, 2003), de um modo geral, a produção de vacinas continua atrelada à utilização dos sais de alumínio (LECLERC, 2003) ou de emulsões oleosas, específicas para vacinas de uso veterinário (JANSEN et al., 2006). Diversos fatores, como a toxicidade e o desconhecimento a respeito dos mecanismos de ação, contribuem para este fato (SINGH; O'HAGAN, 1999). Além disso, nenhuma substância pode ser considerada como um adjuvante universal e a sua utilização

deve ser adaptada ao antígeno vacinal, ao tipo de resposta imune que se deseja estimular, à duração da resposta, bem como à via de inoculação (SCHIJNS, 2000; AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001). Desta forma, o desenvolvimento de novas vacinas e o aperfeiçoamento de vacinas já existentes será altamente beneficiado com a identificação de novas substâncias capazes de promover e direcionar a uma resposta imune apropriada (COX; COULTER, 1997; SINGH; O'HAGAN, 2002).

Além de produtos sintéticos como o hidróxido de alumínio e o óleo mineral, a pesquisa por novos adjuvantes tem se direcionado na utilização de substâncias derivadas de vegetais, como os extratos das plantas *Quillaja saponaria* (DALSGAARD, 1974) e *Quillaja brasiliensis* (FLECK et al., 2006), que potencializam a resposta imune através das saponinas. Paralelamente, a própolis vem despertando o interesse de pesquisadores de todo o mundo em função de inúmeras propriedades bioativas já relatadas, entre elas a capacidade imunomoduladora (DIMOV et al., 1992; ORSI et al., 2000).

O nome própolis é derivado do grego *pro* “em defesa de”, e *polis* “a cidade”, o que significa “em defesa da cidade ou da colméia” (MARCUCCI, 1996). Também conhecida como “cola de abelha”, a própolis é uma complexa mistura de substâncias resinosas e balsâmicas coletadas pelas abelhas em diferentes partes das plantas (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). Na colméia, estas substâncias são transformadas através do acréscimo de secreções salivares e outros produtos das abelhas, como a cera (PINTO et al., 2001; STRADIOTTI et al., 2004).

As abelhas utilizam a própolis para a construção e manutenção das colméias (BURDOCK, 1998), no fechamento de frestas, redução do alvado para diminuição da entrada de vento frio e inimigos naturais, além de embalsamento de pequenos animais, mortos pelas próprias abelhas, que não puderam ser retirados da colméia, evitando com isso a putrefação (MARCUCCI, 1995). A própolis também é utilizada para envernizamento do interior dos alvéolos, permitindo que a rainha faça a postura dos ovos em ambiente não contaminado, e contra a proliferação de microorganismos como bactérias e fungos (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

A complexidade química da própolis é evidenciada por mais de 300 substâncias diferentes identificadas em amostras distintas (BURDOCK, 1998; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000). Sua constituição pode variar de acordo

com a espécie de abelha, época de ano em que é coletada e, especialmente, origem botânica (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; BANKOVA, 2005). Diferentemente dos países de clima temperado, onde a própolis é produzida especialmente a partir de espécies de *Populus* sp. (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000), no Brasil, a rica composição da flora oferece às abelhas um grande número de plantas resiníferas, de onde coletam as secreções para a sua produção. Assim, já foram identificados mais de 12 tipos diferentes de própolis no Brasil (PARK et al., 2002). No sul do país, as espécies botânicas mais utilizadas para a sua produção são as coníferas, como o pinheiro serrano (*Araucária angustifolia* L.), além do *Eucapito citriodora* (BANKOVA et al., 1999; MIDORIKAWA, 2001). Já na região sudeste do Brasil, a principal fonte botânica utilizada para produção de própolis é a planta *Baccharis dracunculifolia* L., conhecida popularmente como alecrim do campo ou vassourinha. Esta espécie, não adaptada às condições naturais existentes em outros países (MIYATAKA et al., 1997), dá origem à própolis verde brasileira, com características químicas e biológicas diferenciadas.

A complexidade química da própolis é reflexo da diversidade da flora utilizada como fonte para a sua produção, dificultando a identificação das substâncias responsáveis por suas atividades terapêuticas. Enquanto nas amostras européias o grupo químico presente em concentrações majoritárias é o dos flavonóides, cujo principal constituinte bioativo é o éster fenil etil do ácido caféico (CAPE), nas amostras brasileiras predominam os compostos fenólicos como artepillin C e o ácido hidroxicinâmico (PEREIRA, et al., 2003). Alguns pesquisadores afirmam que a composição química heterogênea, além da combinação de diferentes substâncias naturais, são essenciais para a atividade biológica da própolis (MATSUNO, 1996; KUJUMGIEV et al., 1999).

Utilizada pelo homem para embalsamar cadáveres desde séculos antes de Cristo (PEREIRA et al., 2002) a própolis apresenta várias propriedades bioativas, dentre as quais se destacam a ação antiviral (BURDOCK, 1998; FISCHER et al., 2005), antiinflamatória (ANSORGE; REINHOLD; LENDECKEL, 2003), antioxidante (SCHELLER et al., 1989), antiparasitária (DECASTRO; HIGASHI, 1995; DANTAS et al., 2006), antitumoral (ORSOLIC et al., 2004; ASO et al., 2004), entre outros. Apesar de muitos mecanismos de ação continuarem desconhecidos, a própolis também tem sido descrita como uma substância com atuação sobre o sistema

imunológico (DIMOV et al., 1992; ORSI et al., 2000), representando uma nova alternativa para tratamentos imunoterápicos (BURDOCK, 1998).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade imunomoduladora de um extrato etanólico da própolis verde brasileira, quando associado a vacinas inativadas contra o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) ou herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), através da mensuração de parâmetros das imunidades humoral e celular de camundongos e bovinos, respectivamente .

2 ARTIGO 1

Submetido à Revista Arquivos do Instituto Biológico

IMUNOMODULAÇÃO PELA PRÓPOLIS

G. Fischer¹, S.O. Hübner¹, G.D. Vargas², T. Vidor²

¹ Laboratório de Virologia e Imunologia – LABVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – Rua Carlos de Carvalho, 372/401 96030-270 – Pelotas – RS. E-mail: geferson.fischer@gmail.com

RESUMO

A própolis, uma substância resinosa produzida pelas abelhas melíferas a partir de exsudatos coletados em diferentes partes das plantas, tem sido utilizada há séculos na medicina popular devido as suas propriedades terapêuticas. Esta substância apresenta atividade antiinflamatória, antitumoral, antioxidante e imunomoduladora, embora muitos dos seus mecanismos de ação sejam desconhecidos. A imunomodulação pela própolis pode estar associada tanto com a estimulação quanto com a supressão de determinados eventos da resposta imune. Os efeitos antagônicos e muitas vezes não complementares sobre o sistema imunológico podem ser decorrentes da grande variabilidade química existente entre diferentes amostras de própolis, bem como das diferentes metodologias adotadas nos estudos científicos, resultando em variada ação farmacológica. Este artigo teve como objetivo revisar e discutir alguns aspectos relacionados à ação da própolis sobre o sistema imunológico.

PALAVRAS-CHAVE: própolis, sistema imunológico, modulação.

¹ LABVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

IMMUNOMODULATION INDUCED BY PROPOLIS

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance produced by honey bees from exudates collected from different parts of the plants. It has been used for centuries in the popular medicine due to its therapeutic characteristics. This substance presents anti-inflammatory, anti-tumoral, anti-oxidant and immunomodulator activities, even though many of its mechanisms of action are still unknown. Immunomodulation induced by propolis can be associated with stimulation as well as suppression of certain events of the immune response. The antagonistic and some times not complementing effects on the immunological system can be attributed to the wide chemical variability present among different propolis samples, as well as to the different methodologies used in scientific studies, resulting in a varied pharmacological action. This work aims at reviewing and discussing some aspects related to the mechanism of action of propolis on the immunological system.

KEYWORDS: propolis, immunological system, modulation

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto resinoso natural produzido pelas abelhas melíferas a partir de substâncias coletadas em diferentes partes das plantas, como brotos, casca, botões florais e exsudatos resinosos (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). As abelhas transportam estas substâncias até a colméia e as modificam através da adição de cera, pólen e produtos do seu metabolismo, como a enzima salivar β glicosidase, aumentando a sua ação farmacológica (PARK et al., 1998; PINTO et al., 2001; PARK et al., 2002; STRADIOTTI et al., 2004).

A composição da própolis é extremamente complexa. Mais de 300 substâncias diferentes já foram identificadas (BURDOCK, 1998; BANKOVA et al., 2000). Suas características constitutivas podem variar de acordo com a espécie de abelha e época do ano em que é coletada (BANKOVA, 2005). Contudo, a origem botânica (BANKOVA et al., 2000; BANKOVA, 2005) parece ser o fator mais importante a ser considerado na tentativa de explicar a variabilidade química entre diferentes amostras de própolis. Em zonas temperadas, como na Europa, América do Norte e regiões não tropicais da Ásia, a fonte dominante para a produção da própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp.) (BANKOVA et al., 2000). As amostras originárias destas regiões são quimicamente similares, predominantemente compostas por substâncias flavonóides como o éster feniletil do ácido cafeico (CAPE) (BANKOVA et al., 2000). No entanto, nas regiões de clima tropical, há uma grande variabilidade química entre as amostras de própolis, em consequência da grande diversidade vegetal utilizada para a sua produção. PARK et al. (2002) identificaram 12 tipos diferentes de própolis no Brasil. A mais conhecida e estudada é a própolis verde, produzida a partir de uma planta conhecida popularmente por alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*). Esta espécie não é adaptada às condições naturais existentes em outros países (MIYATAKA et al., 1997), o que confere à própolis verde características químicas e biológicas diferenciadas. Mais ao sul do país, as resinas de *Araucária angustifolia* L. e *Eucalipto citriodora* contribuem decisivamente para a produção deste apiterápico (BANKOVA et al., 1999; MIDORIKAWA, 2001). Nas amostras brasileiras de própolis os compostos fenólicos, como o artepillin C e o ácido hidroxicinâmico, são as substâncias majoritárias (PEREIRA et al., 2003).

Utilizada pelas abelhas contra a proliferação de microorganismos (BANKOVA et al., 2000), a própolis apresenta várias outras propriedades bioativas. Dentre elas destacam-se a ação antiviral (BURDOCK, 1998; FISCHER et al., 2005), antiinflamatória (ANSORGE et al., 2003), antioxidante (SCHELLER et al., 1989) e antiparasitária (DECASTRO & HIGASHI, 1995; DANTAS et al., 2006). Apesar de demonstradas as suas atividades imunomoduladoras (DIMOV et al., 1992; ORSI et al., 2000; FISCHER et al., 2007), muitos destes mecanismos de ação são desconhecidos. O objetivo deste artigo foi revisar alguns aspectos relacionados à ação da própolis sobre o sistema imunológico.

IMUNOMODULAÇÃO

A imunomodulação pode ser exercida mediante a potencialização ou através de supressão de elementos do sistema imunológico (KIRKLEY, 1999). Este conceito começou a ser formulado em 1796, quando Edward Jenner utilizou a primeira vacina contra a varíola humana. Desde então, vários estudos têm sido conduzidos na busca de substâncias capazes de auxiliar o sistema imune no combate a microorganismos patogênicos, ou a problemas internos, tais como câncer e doenças autoimunes (LABRO, 2000). Atualmente, a utilização de própolis como uma substância imunomoduladora tem sido considerada uma alternativa para a prevenção e cura de diversas enfermidades (ORSOLIC & BASIC, 2003).

A imunomodulação exercida pela própolis ocorre de forma contraditória, as vezes sendo descrita como estimulante, e outras vezes como inibidora de determinados eventos imunológicos. Provavelmente estes efeitos contraditórios se devem, dentre outros fatores, à complexidade química da própolis. Para BANKOVA (2005) comparar amostras de própolis de origens geográficas distintas é o mesmo

que comparar extratos de duas plantas que pertencem a famílias diferentes, tal a sua variabilidade química e, conseqüentemente, suas propriedades farmacológicas. A imunomodulação pela própolis também pode estar diretamente relacionada à forma de extração dos seus compostos bioativos. O tipo de solvente empregado, além do protocolo adotado, poderão resultar em maior ou menor eficiência de extração de determinadas substâncias como os compostos fenólicos, nos quais se concentra a maior parte da atividade farmacológica da própolis. Além disso, a combinação das diferentes substâncias naturais que compõe a própolis, provavelmente resultando em efeito sinérgico, é essencial para a sua atividade biológica (KUJUMGIEV et al., 1999).

PRÓPOLIS E IMUNOESTIMULAÇÃO

Uma das formas de imunomodulação pela própolis ocorre através da ativação de macrófagos (ORSOLIC & BASIC, 2003). Estas células desempenham um papel fundamental na defesa do organismo, através da fagocitose, geração de radicais livres, mediação de processos inflamatórios, e secreção de uma variedade de substâncias bioquimicamente diferentes, como enzimas e componentes do sistema complemento. A ação da própolis sobre os macrófagos resulta em aumento da capacidade fagocítica (ORSI et al., 2000), estimulação da secreção de citocinas tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), e outras substâncias como o óxido nítrico (NO) e metabólitos intermediários de oxigênio (DIMOV et al., 1992; IVANOVSKA et al., 1995a; ORSI et al., 2000; KHAYAL, 2003). Os compostos da própolis solúveis em água (WSPD) atuam estimulando a produção da proteína C1q pelos macrófagos, um componente essencial para a ativação da via clássica do sistema complemento (DIMOV et al., 1992).

Algumas amostras de própolis do Brasil e da Bulgária são capazes de aumentar a atividade bactericida dos macrófagos (ORSI et al, 2005). No entanto, estudos revelaram maior eficiência da própolis brasileira, provavelmente em função de sua composição química diferenciada. Segundo os pesquisadores, metabólitos intermediários de oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO) estavam envolvidos no aumento da atividade funcional destas células.

A atividade imunomoduladora da própolis também pode ser observada através do incremento das respostas imunes celular e humoral, o que foi constatado pelos autores da presente revisão (FISCHER et al. 2007) ao estudarem a capacidade adjuvante de um extrato etanólico da própolis verde brasileira. Quando a própolis foi adicionada ao herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) em uma vacina inativada, inoculada em camundongos, houve um incremento na resposta imune celular, observado através do aumento da expressão de mRNA de interferon gama (IFN- γ), sem no entanto, estimular a resposta humoral. A associação desse extrato com o antígeno (SuHV-1) e hidróxido de alumínio, por sua vez, aumentou tanto a resposta celular quanto a humoral, quando comparado com um tratamento em que o SuHV-1 foi utilizado isoladamente com o hidróxido de alumínio. O efeito adjuvante da própolis verde tornou-se ainda mais evidente no teste de capacidade de proteção vacinal, pois a inclusão do extrato etanólico nas vacinas experimentais aumentou o percentual de animais protegidos após desafio com o SuHV-1, mesmo no tratamento em que a própolis foi utilizada isoladamente com o antígeno e não conferiu aumento da resposta humoral. Neste caso, o incremento na resposta imune celular, proporcionado pela própolis, foi suficiente para a proteção dos animais desafiados. A análise química desta amostra de própolis, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), revelou altos níveis de compostos fenólicos, tais como ácido

cinâmico e derivados. O incremento na proliferação de linfócitos é atribuído à atividade imunoestimulante dos compostos fenólicos (IVANOVSKA et al., 1995b).

Os dados obtidos (FISCHER et al. 2007) estão de acordo com os conceitos formulados por COX & COULTER (1997), permitindo classificar a própolis como um adjuvante não particulado. Segundo estes pesquisadores, os adjuvantes não particulados, considerados imunomoduladores, são aqueles cuja atividade não depende de nenhuma partícula, e que se beneficiam da associação com um adjuvante particulado. Estas substâncias, por não se combinarem ao antígeno, são rapidamente processadas pelas células do sistema imune e induzem uma resposta humoral fraca. Por outro lado, quando um antígeno é adsorvido em um adjuvante particulado, como o hidróxido de alumínio, a partícula formada facilita o seu direcionamento para as células apresentadoras de antígeno, permitindo uma liberação lenta. Com o prolongamento da exposição antigênica às células do sistema imune, a resposta é amplificada. Este fato pode explicar a elevação na resposta humoral ao SuHV-1 nos animais imunizados com a própolis associada ao hidróxido de alumínio (FISCHER et al., 2007). Resultado semelhante foi observado quando a própolis verde foi utilizada como uma substância adjuvante associada a vacinas inativadas contra o herpesvirus bovino tipo 5 - BoHV-5 (FISCHER et al., 2006). Os bovinos que receberam a vacina com própolis apresentaram níveis significativamente mais elevados de anticorpos ($P < 0,01$) em relação a um grupo controle, sem própolis. Segundo SFORCIN et al. (2005), a habilidade em modular a síntese de anticorpos é parte da atividade imunoestimulante da própolis. Apesar do mecanismo detalhado da sua ação sobre células do sistema imune ser desconhecido, a estimulação de macrófagos à produção de citocinas, capazes de

amplificar a resposta imune humoral, pode ser um dos mecanismos adjuvantes (ANSORGE et al., 2003).

A possibilidade de utilização da própolis como adjuvante (FISCHER et al., 2006; 2007), é relevante se considerarmos que um dos principais problemas encontrados na produção de vacinas é a disponibilidade de substâncias que possam potencializar a ação de antígenos pouco imunogênicos, como os inativados e muitos recombinantes. Embora novas substâncias sejam constantemente avaliadas quanto a sua capacidade adjuvante, de um modo geral, a produção de vacinas de uso veterinário continua atrelada à utilização dos sais de alumínio ou de emulsões oleosas. Desta forma, a possibilidade do uso de própolis para promover e/ou direcionar as respostas imunes para determinados antígenos, poderá resultar em um grande benefício na aquisição de imunidade pelo uso de vacinas.

Ao pesquisarem os efeitos dos WSPD de uma amostra croata de própolis ou do CAPE isoladamente, ORSOLIC et al (2004) detectaram aumento na produção de NO pelos macrófagos e inibição na síntese de DNA de células tumorais da linhagem HeLa. Em altas concentrações, o NO é responsável pela indução de apoptose (VEEN et al., 1999), e os resultados obtidos são compatíveis com a capacidade antitumoral da própolis. Segundo estes pesquisadores, esta propriedade pode ser resultado de atividades sinérgicas dos compostos polifenólicos da própolis. Efeito semelhante foi observado no crescimento de células tumorais malignas com a utilização do artemillin C, uma substância bioativa da própolis brasileira. Além da inibição do crescimento destas células (ORSOLIC & BASIC, 2003), foi observado um aumento no número total de linfócitos T auxiliares, indicando ativação do sistema imune (BANSKOTA et al., 2001; PARK et al., 2004). Para BANSKOTA et al. (2001) a citotoxicidade do artemillin C parece ser atribuída à indução de apoptose celular. Os

compostos polifenólicos induzem à apoptose através de um aumento na permeabilidade das membranas mitocondriais, liberação do citocromo C e a sua conjugação com a proteína mitocondrial de choque Apaf-1 e procaspase 9, seguido pela ativação da via das caspases (GALATI et al. 2000).

Similares aos macrófagos, as células exterminadoras naturais (NK), que apresentam atividade lítica para várias células tumorais ou células infectadas por vírus, são consideradas o primeiro mecanismo de defesa do organismo. Aumento na atividade destas células foi observado no baço de camundongos tratados com uma amostra brasileira de própolis (SFORCIN et al., 2002). Além disso, os macrófagos ativados pela própolis produziram citocinas, tal como a IL-12, que atua sobre as células NK, aumentando a sua atividade citotóxica.

A própolis, portanto, pode ser considerada uma importante substância com atividade antitumoral. Apesar desta propriedade ter sido identificada com a utilização de amostras de própolis de origens geográficas diferentes, o mecanismo de ação parece ser semelhante em todos os estudos, com ativação de células imunes como macrófagos e células NK e indução de apoptose por compostos polifenólicos. Desta forma, os dados obtidos têm resultado em uma forte indicação do uso da própolis como uma nova opção para o tratamento de doenças tumorais.

PRÓPOLIS E IMUNOSSUPRESSÃO

A supressão do sistema imunológico pode ter como consequência a proliferação de microorganismos oportunistas que vivem nos organismos vivos ou no ambiente que os cerca e, por este motivo, normalmente é tida como um evento prejudicial. No entanto, há circunstâncias em que a atividade do sistema imune deve ser reduzida ou suprimida. Em casos de transplante, por exemplo, a tendência

natural do sistema imune é desencadear uma reação de defesa e os indivíduos transplantados correm o risco de ser acometidos por processos inflamatórios crônicos e fibrose, que podem levar à insuficiência irreversível do órgão transplantado e a sua rejeição. Nestes casos, potentes drogas imunossupressoras são necessárias para inibir a ativação das células T e aumentar a taxa de sobrevivência dos enxertos. Também as doenças autoimunes devem ser controladas através do uso de agentes imunossupressores.

As substâncias flavonóides encontradas na própolis podem inibir a proliferação de linfócitos de camundongos *in vitro* (SÁ-NUNES et al., 2003). Uma amostra brasileira de própolis se mostrou capaz de ativar macrófagos *in vivo*, estimulando a produção de IFN- γ e NO e, conseqüentemente, reduzindo a proliferação de linfócitos. Níveis suficientemente elevados de IFN- γ estimulam a atividade da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) por macrófagos ativados, gerando concentrações de NO que prejudicam a proliferação de células T (GHERARDI et al., 2000). O NO tem sido considerado o principal fator derivado de macrófagos com atividade imunossupressora (MILLS, 1991).

A redução no número de células T também pode ocorrer através da ação de um composto ativo da própolis, o CAPE (PARK et al., 2004). A ativação destas células induz a expressão de fatores de transcrição como o NF- κ B, que regula a expressão de genes envolvidos na resposta imune, estimulando a expressão de citocinas inflamatórias, moléculas do complexo de histocompatibilidade principal e a adesão de moléculas envolvidas na metástase de tumores (ORBAN et al., 2000; BAEZA-RAJA & MUÑOZ-CÁNOVES, 2004). O CAPE é um inibidor específico do NF- κ B e suprime a sua interação com o DNA dos linfócitos (NATARAJAN et al., 1996; PARK et al., 2004) inibindo a resposta linfoproliferativa, provavelmente devido

à inibição da expressão gênica. (MÁRQUEZ et al., 2004). Além de inibir o NF- κ B, o CAPE é capaz de inibir o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), resultando em inibição da transcrição do gene de IL-2 e da proliferação de células T.

Portanto, a própolis ou algumas de suas substâncias bioativas, como os flavonóides, pode ser utilizada como droga imunossupressora em associação ou substituição de outros imunossupressores, como os corticosteróides. O mecanismo de ação da própolis, neste caso, é semelhante ao destas substâncias, inibindo o NF- κ B, estimulando a produção de NO ou alterando a expressão de genes de citocinas sem, no entanto, haver relato de efeitos adversos. A divergência destes dados com os obtidos por FISCHER et al. (2006; 2007), que detectaram aumento nas respostas imunes humoral e celular, provavelmente se deve à diferença na composição das amostras de própolis utilizadas, bem como na metodologia empregada.

A inibição do NF- κ B pela própolis também está estreitamente relacionada com a sua propriedade antiinflamatória. A hipótese levantada por SONG et al. (2002), utilizando uma amostra coreana de própolis, e reforçada por Paulino (comunicação pessoal) que utilizou a própolis verde brasileira, é de que a atividade antiinflamatória da própolis se deve à inibição na expressão do gene da iNOS, interferindo no sítio NF- κ B do promotor iNOS. Neste caso, há uma redução na produção de NO, um importante mediador biológico envolvido nos processos inflamatórios e imunológicos (NUSSLER & BILLIAR, 1993). Segundo CHEN et al. (2005), substâncias flavonóides como o CAPE inibem a ativação do NF- κ B, reduzindo a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória aguda, incluindo os das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Resultado semelhante foi obtido por BLONSKA et al. (2004) que, utilizando um extrato etanólico de uma amostra polonesa de própolis,

detectaram inibição da expressão dos genes de IL-1 β , em uma linhagem de macrófagos (J774A.1).

O CAPE também pode atuar sobre os macrófagos inibindo a produção das enzimas lipoxigenase e cicloxigenase (KHAYYAL et al., 2003) e a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), um importante mediador inflamatório (MIRZOEVA & CALDER, 1996). Redução nos níveis de PGE₂ e das citocinas IL-6 e IL-8 foi observada em processos inflamatórios crônicos das vias aéreas, como a asma (KHAYYAL et al., 2003), após a administração de extratos de própolis de origens geográficas diversas, demonstrando um grande potencial para tratamento dessas alterações. Atualmente, substâncias imunossupressoras como os corticosteróides tópicos ou sistêmicos são utilizadas para suprimir as alterações inflamatórias crônicas observadas na asma. Entretanto, segundo ROMAGNANI (1997), o ideal é que se possa converter a resposta das células T aos antígenos alérgenos, de uma resposta predominantemente humoral (Th2) para celular (Th1). Neste sentido, a ação antiinflamatória da própolis pode ser promissora para tratamento de indivíduos asmáticos. Ao analisar-se os resultados dos estudos conduzidos por SY et al. (2006) em um modelo para estudo de asma em camundongos, a utilização da uma solução aquosa de própolis inibiu a produção de citocinas relacionadas à resposta humoral (IL-10 e IL-5) e aumentou a resposta de células T CD4⁺, demonstrando tendência de modulação do sistema imune para a resposta celular.

A ação antiinflamatória da própolis também ocorre através da inibição do sistema complemento. A diminuição na atividade da via alternativa foi atribuída à inibição da função da proteína C3 convertase, um dos alvos de ação dos WSPD no sistema complemento (IVANOVSKA et al., 1995a). A interação da própolis com proteínas do sistema complemento pode resultar em mudanças conformacionais e,

conseqüentemente, na perda de função. A hipótese destes autores é que os flavonóides são as substâncias da própolis com atividade anti-complemento. Apesar de ser um dos principais mecanismos pelos quais o reconhecimento do antígeno é convertido em uma defesa efetiva contra uma infecção, o sistema complemento pode estar envolvido em resposta inflamatórias indesejáveis. Desta forma, a ação anti-complemento da própolis pode ser altamente benéfica, pois através da inibição de importantes mediadores da inflamação derivados do sistema complemento, reduz os efeitos adversos de determinados processos inflamatórios.

CONCLUSÃO

A imunomodulação causada pela própolis tem sido observada tanto na estimulação como na supressão de determinados eventos da resposta imune, tornando-a potencialmente aplicável como uma substância imunoestimulante, ou no combate a processos inflamatórios indesejáveis ou tumores. Apesar de vários estudos abordarem a influência da própolis sobre o sistema imunológico, muitos resultados não são complementares ou tornam-se antagônicos, provavelmente em função de diferenças metodológicas ou da grande diversidade química entre as amostras de própolis utilizadas. Os dados indicam a necessidade de ampliação dos estudos relacionados às propriedades bioativas da própolis, visando o esclarecimento destas contradições.

REFERÊNCIAS

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. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.58c, p.580-589, 2003.

BAEZA-RAJA, B.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. p38 MAPK-induced nuclear factor-kB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Molecular Biology of the Cell*, v.15, p.2013-2026, 2004.

BANKOVA, V.; KRASTEVA, G.B.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; RODELLA, R.M.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.54, p.401-405, 1999.

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

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.114-117, 2005.

BANSKOTA, A.H.; TESUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, v.15, p.561-571, 2001.

BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, G.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z.P.; SCHELLER, S.; KROL, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v.91, p.25-30, 2004.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

CHEN, M.; KENG, P.C.; LIN, P.Y.; YANG, C.; LIAO, S.; CHEN, W. Caffeic acid phenethyl ester decreases acute pneumonitis after irradiation *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer*, v.5, n.158, p.1-9, 2005.

COX, J.C.; COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, v.15, n.3, p.248-256, 1997.

DANTAS, A.P.; OLIVIERI, B.P.; GOMES, F.H.M.; DE CASTRO, S.L. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of Ethnopharmacology*, v.103, p.187-193, 2006.

DE CASTRO, S.L.; HIGASHI K. Effect of different formulation of propolis on mice infected with *Trypanossoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.46, p.55-58, 1995.

DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. *Vaccine*, v.10, n.12, p.817-823, 1992.

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.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, L.D.; HÜBNER, S.O.; DELLAGOSTIN, O.A.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1, *Vaccine*, v.25, p.1250-1256, 2007.

FISCHER, G.; CLEFF, M.B.; DUMMER, L.A.; CAMPOS, F.S.; STORCH, T.; QUINCOZES, C.G.; VILELA, C.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T. Avaliação da capacidade coadjuvante de um extrato alcoólico de própolis verde em bovinos vacinados contra o Herpesvírus Bovino tipo 5. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 2006, Aracaju, SE. Anais. Aracaju, 2006.

GALATI, G.; TENG, S.; MORIDANI, M.Y.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J. Câncer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, v.17, p.311-349, 2000.

GHERARDI, M.M.; RAMIREZ, J.C.; ESTEBAN, M. Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. *Journal of Virology*, v.74, n.4, p.6278–6286, 2000.

HWANG, D. Essential fatty acids and immune response. *The FASEB Journal*, v.3, p.2052-2061, 1989.

IVANOVSKA, N.D.; DIMOV, V.B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivate. *Journal of Ethnopharmacology*, v.47, p.135-143, 1995.

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*, v.26, p.73-81, 1995.

KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S.; HATEM, A.M.; VRIES, P.J.F.; EL-SHAFEI, S.; KHATTAB, M.M. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v.17, p.93-102, 2003.

KIRKLEY, S.A. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.6, n.5, p.652-657, 1999.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, v.64, p.235-240, 1999.

LABRO, R. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, n.4, p.615-650, 2000.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v.26, p.83-99, 1995.

MÁRQUEZ, N.; SANCHO, R.; MACHO, A.; CALZADO, M.A.; FIEBICH, B.L.; MUNOZ, E. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcriptions factors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.308, n.3, p.993-1001, 2004.

MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSISHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.; KADOTA, S. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis*, n.12, p.366-373, 2001.

MILLS, CD. Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *The Journal of Immunology*, v.146, p.2719-2723, 1991.

MIRZOEVA, O.K.; CALDER, P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.55, n.6, p.441-449, 1996.

MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.L.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.L.; SATOH T. Evaluation of propolis. I: Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.20, n.5, p.496-501, 1997.

NATARAIAN, K.; SINGH, S.; BURKE, T.R.; GRUNBERGER, D.; AGGARWAL, B.B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kB. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, v.93, p.9090-9095, 1996.

NUSSLER, A.K.; BILLIAR, T.R. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology*, v.54, n.2, p.171-178, 1993.

ORBAN, Z.; MITSIADES, N.; BURKE, T.R.; TSOKOS, M.; CHROUSOS, G.P. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation*, v.7, p.99-105, 2000.

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.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.; BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology*, v.5, n.2, p.359-368, 2005.

ORSOLIC, N. & BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.84, p.265-273, 2003.

ORSOLIC, N.; KNEZEVI, A.H.; SVER, L.; TERZI, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, v.94, p.307-315, 2004.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.3. p.313-318, 1998.

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.

PARK, J.H.; LEE, J.K.; KIM, H.S.; CHUNG, S.T.; EOM, J.H.; KIM, K.A.; CHUNG, S.J.; PAIK, S.Y.; OH, H.Y. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *Internacional Immunopharmacology*, v.4, p.429-436, 2004.

PEREIRA, A.S.; PEREIRA, A.F.M.; TRUGO, L.C.; AQUINO NETO, F.R. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.58c, p.590-593, 2003.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.38, n.6, p.278-283, 2001.

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today*, v.18, n.6, p.263-266, 1997.

SÁ-NUNES, A.; FACCIOLO, L.H.; SFORCIN, J.M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *Journal of Ethnopharmacology*, v.87, p.93-97, 2003.

SHELLER, S.; OWCZAREK, S.; KROL, W.; MALINOWSKA, B.; NIKODEMOWICS, E.; ALEKSANDROWICZ, J. Immunisierungsversuche bei zwei fallen von alveolitis fibroticans bei abnehmender leistungsfähigkeit des immunsystems unter anwendung von propolis-athanolextrakt (EEP), esberitox N und eines calcium-magnesium-preparates (dolomit.). *Heikunst*, v.102, p.249-255, 1989.

SFORCIN, J.M.; KANENO, R.; FUNARI, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.8, n.1, p.19-29, 2002.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology*, v.98, n.3, p.301-305, 2005.

SONG, Y.S.; PARK, E.; 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.

STRADIOTTI, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; PACHECO, C.G.; EIFERT, E.C.; NUNES, P.M.M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004.

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

VEEN, R.C.; DIETLIN, T.A.; PEN, L.; GRAY, J.D. Nitric oxide inhibits the proliferation of T-helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion. *Cellular Immunology*, v.193, p.194–201, 1999.

3 ARTIGO 2

Vaccine, v.25, p.1250-1256, 2007.

Available online at www.sciencedirect.com

Vaccine 25 (2007) 1250–1256

www.elsevier.com/locate/vaccine

Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1

Geferson Fischer^{a,b,*}, Fabricio Rochedo Conceição^{a,b}, Fábio Pereira Leivas Leite^{a,c},
Luana Alves Dummer^{a,b}, Gilberto D'Avila Vargas^b, Sílvia de Oliveira Hübner^b,
Odir Antônio Dellagostin^{a,c}, Niraldo Paulino^d, Amarflis Scremin Paulino^d, Telmo Vidor^b

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CP 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

^b Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPel, CP 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

^c Instituto de Biologia, UFPel, CP 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

^d Curso de Farmácia, Universidade Barriga Verde, UNIBAVE, Rua Miguel Couto 330, 88870-000 Orleans, SC, Brazil

Received 4 September 2006; received in revised form 4 October 2006; accepted 4 October 2006

Available online 18 October 2006

Summary

Despite recent technological advances in vaccine production, most the vaccines depend on the association with adjuvant substances. This work evaluated the adjuvant capacity of an ethanol extract of green propolis associated to inactivated Suid herpesvirus type 1 (SuHV-1) vaccine preparations. Mice inoculated with SuHV-1 vaccine plus aluminum hydroxide and 5 mg/dose of propolis extract presented higher levels of antibodies when compared to animals that received the same vaccine without propolis. The use of SuHV-1 vaccine with propolis extract alone did not induce significant levels of antibodies, however it was able to increase the cellular immune response, evidenced by the increase in the expression of mRNA to IFN- γ . Besides, propolis increased the percentage of protected animals against challenge with a lethal dose of SuHV-1. The effect of green propolis extract on the humoral and cellular immune responses may be exploited for the development of effective vaccines.

Keywords: green propolis; adjuvant; vaccines

1. Introduction

Vaccination has been a common practice for preventing or minimizing symptoms of diseases caused by infectious or parasitic agents in humans or animals. Traditionally, vaccines have been developed from live attenuated or inactivated pathogens [1], however synthetic peptides and recombinant proteins constitute the basis of new generation vaccines [2,3]. Despite representing an important technologic advance, the success of many of these subunit vaccines depends on their association with potent adjuvants, aiming at increasing their immunogenicity. In order to have an effective protection against the pathogen, it is necessary an efficient activation of specific effectors of the immune system, such as antibodies, cytotoxic or auxiliary T cells (Th1/Th2) [4]. Adjuvant substances when associated to an antigen modify or increase the potency of the humoral and/or cellular immune responses against that antigen [5,3]. Besides, they can be used to prolong the immune response or to promote mucosal immunity [4]. Even though a large number of adjuvants of several origins has been evaluated, most commercial vaccines continues to rely on the used of aluminum salts. This way, the development of new vaccines will be highly benefited if new substances capable of promoting and directing to an appropriate immune response were identified [4].

Propolis is a natural resinous substance, harvested by honeybees from different parts of plants such as shoots, buds and resinous exudates [6,7]. Chemically complex, propolis is composed by more than 300 different substances [7,8]. The combination of these substances, probably resulting in a synergic effect, is essential for its biological activity [9]. Its constitutive characteristics, however, can vary according to the bee species, period of the year in which it is collected and, especially botanic origin [10]. Green propolis, characteristic from Brazil, is produced

from a plant commonly known as “Alecrim do Campo” (*Baccharis dracunculifolia*). This species is not adapted to the natural conditions of other countries [11], which confers to the green propolis chemical and biological characteristics different from the European propolis, produced predominantly from the exudates of buds of aspen (*Populus* sp.) [8].

Used by bees against microorganisms like bacteria, virus and fungi [7,8], propolis has several other bioactive properties such as anti-inflammatory [12,13], antioxidant [14], antiparasitary [15] and anticarcinogenic action [16]. Although its immune-stimulant and immune-modulator activities have been demonstrated [17-19], the mechanism of action remains unknown.

Suid Herpesvirus type 1 (SuHV-1), from *Herpesviridae* family, Alphaherpesvirinae subfamily, is the causing agent of Aujeszky disease, an infectious contagious disease responsible for high economical losses in the swine production due to high mortality and reproductive disorder [20]. The pathogenicity of this virus in mice allows its experimental use in tests to certify the efficiency of the vaccines [21].

The aim of this work was to evaluate the adjuvant properties of an ethanolic extract of green propolis, when added to inactivated SuHV-1 vaccine, used to immunize mice. Parameters of the humoral (neutralizing antibodies titer) and cellular immunity (levels of IFN- γ mRNA), as well as the protection (experimental challenge) afforded by vaccine preparations were determined.

2. Material and methods

2.1 Ethanolic extract of green propolis

Green propolis was obtained from Nectar Farmacêutica Ltda (Brazil) and stored at -20 °C. The ethanolic extract was prepared as previously described [13].

Briefly, the propolis was ground and macerated with an extract solution containing absolute ethanol, with 10 min daily agitation, for 10 days. Then, the solvent was evaporated and the resulting dried matter was dissolved in phosphate buffer solution (pH 6.2), in a final concentration of 40 mg/ml.

2.2 Vaccine preparations and inoculations

Two experiments were carried out: the first one aimed at evaluating the adjuvant capacity of the ethanolic extract of green propolis through neutralizing antibody titration and determination of 50% protective dose of experimental vaccine preparations. The second experiment was carried out to determine the levels of IFN- γ mRNA expression by reverse transcription-PCR (RT-PCR). All experimental vaccine preparations were produced from a SuHV-1 isolate obtained from an outbreak of Aujeszky disease and maintained in the Virology and Immunology Laboratory, UFPEl (Pelotas – Brazil). After growing the virus in Rabbit Kidney cell line - RK₁₃ (ATCC), viral suspensions with titer of $10^{5.75}$ CCID₅₀/25 μ l (cell culture infections dose 50%/25 μ l), were inactivated with bromoethylamine – BEI (C₂H₇Br₂N, - Merck), 20 mM, pH 7.5.

In the first experiment, 120 female BALB/c mice, 6-8 week-old, allocated into three groups, were inoculated at day 0 and 14, subcutaneously (SC) with 0.5 ml of the inactivated vaccine preparations. Group 1 received vaccine with aluminum hydroxide (Al(OH)₃), group 2 received vaccine with Al(OH)₃ and propolis extract (5 mg/dose) and group 3 received vaccine with propolis (5 mg/dose). In the fourth group (negative control), 10 animals were kept without vaccination. In order to estimate protection afforded by each treatment, using the statistic method of Reed & Muench [22], each vaccine preparation was diluted two, four, eight and sixteen times and

inoculated in 10 individually identified mice. In all cases the initial titer of the virus suspension was the same.

In the second experiment, 25 mice distributed into five groups were subcutaneously inoculated with 0.5 ml at day 0 and 14. Group one received 5 mg/dose of propolis extract (positive control); group two was inoculated with saline solution (PBS, pH 7.2 - negative control); group three received vaccine with $\text{Al}(\text{OH})_3$; group four received vaccine with propolis extract (5 mg/dose), and group five received vaccine with $\text{Al}(\text{OH})_3$ and propolis extract (5 mg/dose). All animals, supplied by Biotério Central of UFPEl (Pelotas-Brazil), remained isolated, in controlled environment with temperature between 22-24 °C, receiving feeding and water *ad libitum*. The experiment was approved by the UFPEl Committee of Ethics in Animal Experimentation.

2.3 Humoral immunity and protection

For titering neutralizing antibodies against SuHV-1, blood samples were collected from four animals from each experimental group, 21 days after the second inoculation. After total bleeding, the blood was processed and the serum was stored at -20 °C. Antibodies were titered by the serum neutralization method [21]. Briefly, each serum was serially diluted from 1:2 to 1:256, and distributed (25 µl) in quadruplicate in polystyrene plate (TPP). A volume of 25 µl of SuHV-1 virus suspension containing 100 CCID₅₀% was then added. After incubation for 1 hour at 37 °C in an environment with 5% CO₂, approximately 30,000 RK₁₃ cells were added per well. The microplates were then returned to the incubator until being read in an inverted microscope when the 100 CCID₅₀% was observed in the control cells. The absence of cytopathic effect was indication of viral neutralization, while its presence

resulted from the absence of neutralizing antibodies. Antibody titers were calculated by the Behrens & Kärber method [22].

In order to evaluate protection afforded by the experimental vaccine preparations, 21 days after the second vaccination the remaining animals were inoculated subcutaneously with 0.1 ml containing 31.6 lethal doses (LD) of SuHV-1 (strain used in vaccine preparation) [21]. Daily, until the tenth day after the challenge, the number of dead animals in each experimental group was recorded for analysis by the statistical method of Reed & Muench [22]. For the LD calculation, starting from a viral suspension with $10^{5.75}$ CCID₅₀/25%I, the same statistical methodology was used.

2.4 Cellular immunity

The IFN- γ mRNA level in splenocytes from mice inoculated in the second experiment was used as a parameter for cellular immunity evaluation. The splenocytes were processed according to Bastos et al. [23]. Briefly, a splenocyte suspension was obtained from a pool of spleens of mice from each treatment, 21 days after the second inoculation. After lysing the red blood cells with NH₄Cl, the spleen cells were counted and 10^7 cells/ml were then suspended in Minimum Essential Medium – MEM (Gibco-BRL), supplemented with 10% of bovine fetal serum (Gibco-BRL) and plated in a 96 well plate. After 24 h of incubation at 37 °C in an environment with 5% CO₂, the supernatant was removed and the cells were stimulated in triplicate, with MEM (negative control), 0.1 multiplicity of infection (MOI) of SuHV-1 or 5 μ g/ml of Concanavalin A (Sigma). Twenty-four or 48 h after stimulation, total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. The cDNA synthesis was performed from 5 μ g of total RNA,

in a 25 μ l reaction containing 0.5 μ l (150 ng) of random primers (Invitrogen), 1 μ l of desoxynucleoside triphosphates (dNTP - 10 mM), 1 $\times$ First Strand buffer (New England Biolabs), 0.1 M DDT, 40 U of RNaseOUT (Invitrogen) and 50 U of M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs), following previously described methodology [24]. After incubating for 10 min at 25 $^{\circ}$ C, the samples were incubated at 42 $^{\circ}$ C for 50 min, followed by 70 $^{\circ}$ C for 15 min, in an thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient). The resulting cDNA was stored at -20 $^{\circ}$ C. PCR reactions were carried out in triplicate with 2 μ l of cDNA, 200 μ M of dNTPs, 1 $\times$ reaction buffer, 1.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1 μ M of each primer, 3 mM $MgCl_2$ for IFN- γ or 1.5 mM for β -actin, and RNase free water (Gibco-BRL) in a final volume of 25 μ l. The thermocycler parameters were as follows: 95 $^{\circ}$ C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 50 sec, 60 $^{\circ}$ C for 50 sec and 72 $^{\circ}$ C for 1 min, with a final extension of 72 $^{\circ}$ C for 7 min. The primers used in this experiment, described in the literature [24] and synthesized by MWG-Biotech Inc. (USA), were: IFN- γ forward 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG; IFN- γ reverse 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG; β -actin forward 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC; β -actin reverse 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG. PCR reactions using primers for β -actin and PCR reaction without cDNA was carried out as a controls. PCR products were visualized under UV light after electrophoresis in 2% agarose gel containing ethidium bromide. Analysis of the data was done using Scientific Imaging System software (Kodak).

2.5 Statistical Analysis

Antibody titers, expressed in Log_2 , were compared using variance analysis (ANOVA). The LSD test was used to determine significant differences ($p < 0.05$) among the mean of each treatment using the SAS program. The protection afforded by the experimental vaccine preparations was evaluated through the statistical method of Reed & Muench [22].

3. Results

3.1 Humoral immunity

The mean $\pm$ S.E.M. of the antibody titers of each experimental group are presented in Figure 1. As it can be observed, the association of 5 mg/dose of ethanolic extract of green propolis to an inactivated vaccine against SuHV-1 containing aluminum hydroxide showed significant adjuvant effect. In all the dilutions of this vaccine preparation there was an increment in the antibody titers when compared to the vaccine with aluminum hydroxide alone. This effect was more evident in the intermediate dilutions ($p < 0.05$) where the titer went from 3 to 4.49 when the vaccine was diluted 4 times and doubled, going from 2.18 to 4.48 in the 1:8 dilution. In the 1:16 dilution, probably due to the low quantity of antigen present in each dose, antibody titers were similar in all treatments.

Association of the propolis extract on its own with inactivated SuHV-1, however, did not induce a significant production of antibodies (Fig. 1). The lowest titers in this experiment were obtained from mice inoculated with this vaccine preparation.

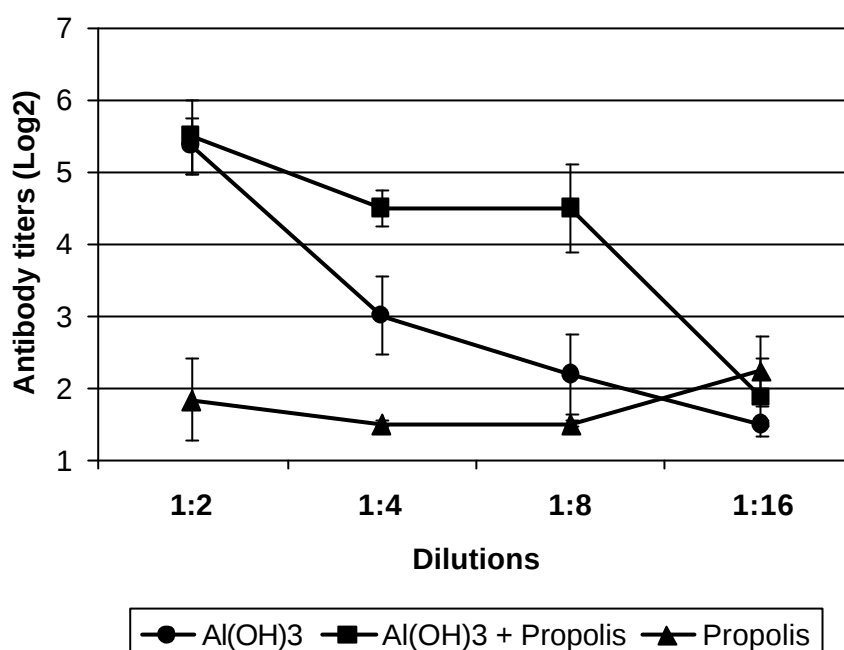


Fig. 1. Antibody titers (Log₂) of mice immunized with SuHV-1 associated to Al(OH)₃, Al(OH)₃ + 5 mg/dose of ethanolic extract of green propolis or 5 mg/dose of ethanolic extract of green propolis. The titer was determined by the serum neutralization test, 21 days after the second inoculation. All the vaccines were diluted 2, 4, 8 or 16 times. The data represents the mean $\pm$ S.E.M. Different letters indicate significant statistical difference ($p < 0.05$).

3.2 Protection afforded by the vaccine preparations

The percentage of animals protected after inoculation with the experimental vaccine preparations in the different dilutions, and challenged with 31.6 DL of SuHV-1, can be observed in Figure 2. Only the vaccine preparation with aluminum hydroxide, in the 1:2 dilution, protected 100% of the animals. However the association of green propolis extract to this vaccine preparation increased the percentage of animals protected in the higher dilutions (1:4, 1:8 e 1:16). In this case, the higher the dilution of the vaccine, the bigger the percent difference of animals

protected, suggesting immunostimulant action of the propolis extract. These data is compatible with the antibody titers of the same animals. Surprisingly, the vaccine preparation in which propolis was associated on its own with the antigen allowed good levels of protection in all the dilutions evaluated (1:2 – 92%; 1:4 – 85%; 1:8 – 80% and 1:16 – 68%), contrary to the serologic results. By the tenth day after challenge, all animals from the control group were dead, suggesting that the protection in the other groups occurred due to the immunizations.

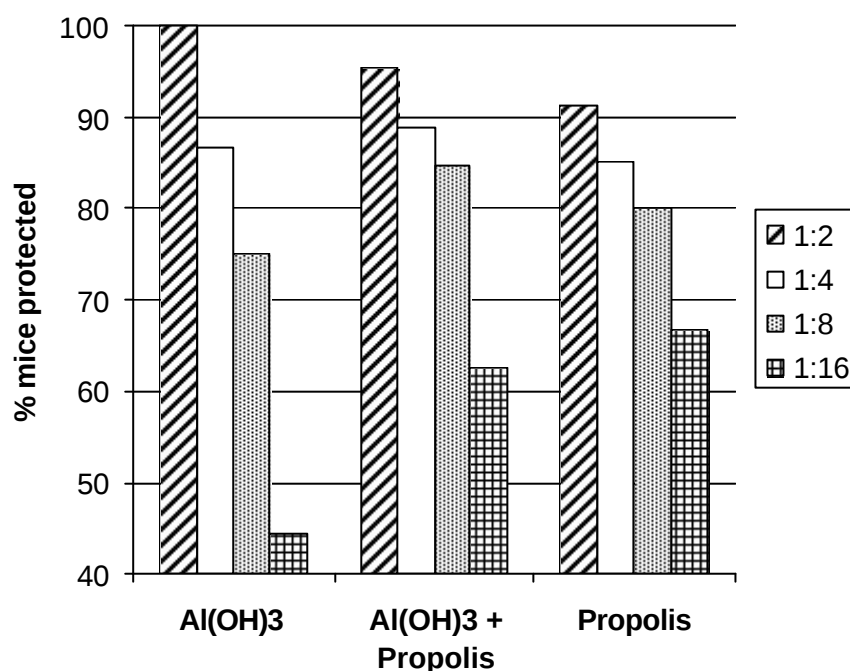


Fig. 2. Percentage of mice protected in the test of protection capacity afforded by the experimental vaccines. Each animal was immunized with two doses of a vaccine containing SuHV-1 associated to Al(OH)₃, Al(OH)₃ + 5 mg/dose of ethanolic extract of green propolis or 5 mg/dose of ethanolic extract of green propolis, diluted from 1:2 to 1:16. Twenty-one days after the second inoculation the animals were challenged with 31.6 LD of SuHV-1. All animals from the negative control (non-vaccinated) died (result not shown). The number of dead and alive in each experimental group was analyzed by the Reed & Muench [22] statistical method.

3.3 Cellular immunity

In order to evaluate the effect of the ethanolic extract of green propolis on the cellular immune response, a semi-quantitative method of measurement (RT-PCR) of the IFN- γ mRNA expression was used. As it can be observed in Figure 3A, 24 h after splenocyte stimulation with 0.1 MOI of SuHV-1, there was a significant increase in the IFN- γ mRNA expression in the animals inoculated with the vaccine preparation containing aluminum hydroxide and propolis (sample 3), in relation to the vaccine preparation without propolis (sample 2). In addition, when propolis alone was associated with the antigen, expression of IFN- γ mRNA was even higher, superior than the other treatments (sample 4). The expression of β -actin mRNA did not vary in the different treatments, indicating a specific stimulus in the IFN- γ expression. Forty-eight hours after splenocyte stimulation, the results remained the same (Fig. 3B). The highest IFN- γ mRNA expression occurred when propolis alone was inoculated with the antigen, followed by the association of propolis and aluminum hydroxide. The lowest expression was when aluminum hydroxide alone was used with the antigen, suggesting an immunostimulant effect of propolis on the cellular immune response to SuHV-1.

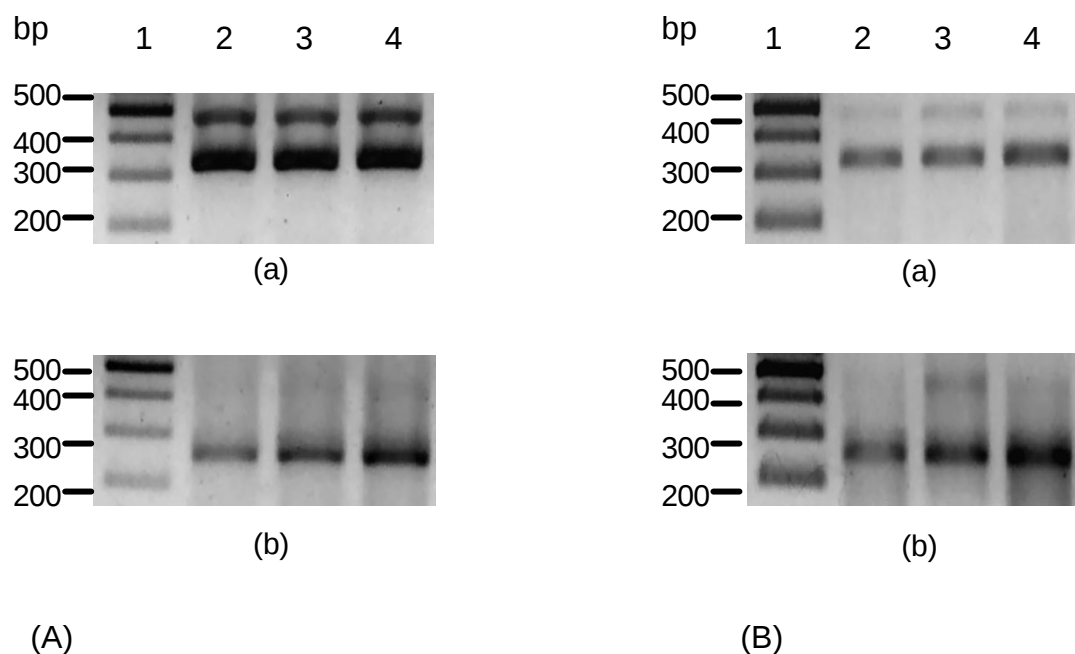


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products resulting from the amplification of IFN- γ mRNA from mice splenocytes collected 21 days after the second inoculation with the different experimental vaccine preparations. (A). Twenty-four hours after stimulating the splenocytes with 0.1 MOI of SuHV-1: (a) β -actin used as internal control; (b) IFN- γ – 1. GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Invitrogen); 2, Al(OH) $_3$; 3, Al(OH) $_3$ + propolis (5 mg/dose); 4, propolis (5 mg/dose). (B) Forty-eight hours after stimulating the splenocytes; (a) β -actin used as internal control; (b) IFN- γ – 1, GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Invitrogen); 2, Al(OH) $_3$; 3, Al(OH) $_3$ + propolis (5 mg/dose); 4, propolis (5 mg/dose).

4. Discussion

Several strategies have been pursued aiming at inhibiting the growth and dissemination of pathogenic microorganisms due to economical losses caused in different productive systems. Priority has been given to the development of vaccines

which generate an appropriate immune response [26]. Despite technological advances in molecular biology and in genetic engineering, allowing identification of antigens with immunogenic potential [3], the majority of vaccines requires association with adjuvants capable of increasing the potency or stimulating the appropriate immune response [5,3].

In this study, the adjuvant capacity of an ethanolic extract of Brazilian green propolis was evaluated when associated to inactivated SuHV-1 with or without aluminum hydroxide, in BALB/c mice. The addition of 5 mg/dose of this extract [26,27] to the vaccine with aluminum hydroxide increased the potency of the humoral immune response when compared to the vaccine without propolis, determined by neutralizing antibody titers, 21 days after the second dose. This adjuvant effect was more evident when the vaccine was diluted (1:4 and 1:8 – $p < 0.05$), suggesting that the lowest the antigenic mass in the vaccine or less immunogenic the antigen, more pronounced is the propolis effect. According to Sforzin et al. [28], the ability of modulating the synthesis of antibodies is part of the propolis adjuvant activity. Despite the fact that the precise mechanism of action of propolis on the immune system cells remains unknown [12], stimulation of macrophages to produce cytokines such as IFN- γ , with further general amplification of the immune response [16,29], can be one of its main adjuvant mechanisms.

The increase in the potency of the humoral immune response, however, was not detected when propolis alone was associated to inactivated SuHV-1. The neutralizing antibody titers, in this case, were the lowest among all experimental groups, compared only to the highest dilutions (1:16) of the other treatments. This fact can be understood if the propolis is classified as a nonparticulate adjuvant, as suggested by Cox and Coulter [30]. According to these authors, nonparticulate

adjuvants acting as immunomodulators are those which the activity does not depend on any particle, and benefit from the association with a particulate adjuvant. These substances, as they do not attach to the antigen, are rapidly processed by the immune system cells (inducing a weak response) and do not impair the loss of their conformational integrity [30]. On the other hand, when the antigen is absorbed in a particulate adjuvant, such as aluminum hydroxide, the particle formed facilitates its direction to antigen present cells. Besides, this association allows a slow liberation of the antigen, increasing the exposure time to the immune system, extending the response [30,31]. This fact might explain the increase in the neutralizing antibody titers to SuHV-1 of the vaccine preparation in which propolis plus aluminum hydroxide were associated to the antigen.

The evaluation of humoral and/or cellular responses induced by a vaccine or even an adjuvant substance should not be the only parameter analyzed for its validation [32]. It is necessary an effective protection of the immunized animal in the event of exposition to the pathogen. In this sense, six animals from each experimental group were challenged with 31.6 LD of SuHV-1 [21], 21 days after the last vaccination. The results obtained highlight the adjuvant capacity of the Brazilian green propolis extract used. Comparing the vaccines with aluminum hydroxide, the addition of the extract resulted in an increase percentage of protected animals, especially in the higher dilutions. The high percentage of animals which survived the challenge in the immunized group with the antigen and the propolis extract was also surprising. The lack of correlation with the results obtained in the serological tests suggest the role of cellular immunity in the protection against SuHV-1. It is likely that activation of macrophages was one of the main adjuvant mechanisms in this case.

Activation of T lymphocytes causes a series of ordered interactions and events, including activation of transmembrane signals and expression of cytokine genes. Attributes such as stability and rate of synthesis of mRNA and proteins are altered. The result of this process is the proliferation and differentiation of T cells and production of cytokines [33]. An important functional attribute of the immune system cells is the capacity of synthesizing and secreting cytokines, which bind to specific receptors in the surface of a target cell. After binding, the cytokines act regulating the growth and/or the differentiation of these cells, optimizing the immune response [12]. The development of a cellular or humoral immune response depends on a wide range of cytokines produced by several cells, including CD4⁺ (Th1 and Th2) and CD8⁺ T cells. The IFN- γ produced by Th1 cells is an essential cytokine in the cellular immune response, classically described as a defense mechanism against viral infections [34].

Besides increasing the potency of the humoral immune response, the use of green propolis extract also allowed an increase in the cellular response, increasing the synthesis of mRNA of IFN- γ . The IFN- γ expression was higher in splenocytes of mice immunized with SuHV-1 plus propolis, explaining the higher percentage of animals protected in this group after challenge. These results are similar to the ones obtained by Blonska et al. [35] working with a European propolis sample, for whom the ethanolic extract acts regulating gene expression at transcriptional level. Other authors, using either propolis of Brazilian or European origin, also reported increase in cytokine secretion in animals receiving propolis [29,35,36]. Ansorge et al. [12], using a Polish sample, reported that propolis has a regulatory effect directly on the basic functional properties of the immune system, which can be mediated by the Erk2 MAP-kinase signal involved in mechanisms that promote cellular growth.

In a previous study, multivariate analysis associating ethanol extracts of different samples with the levels of bioactive compounds determined by high performance liquid chromatography (HPLC) allowed the typing of Brazilian propolis [37]. Green propolis showed high levels of phenolic compounds such as artemillin C, in addition to cinnamic acid and flavonoids such as pinobanksin and kaempferol. The precise mechanism of action of propolis remains unknown [12], however, these compounds may have stimulated the immune system cells to produce cytokines like IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 and IFN- γ [26,29,36], promoting an increase in the humoral as well as the cellular immune response.

In our study, an ethanolic extract of green propolis acted as a modulator of the immune system. In mice immunized with SuHV-1, the association of propolis and aluminum hydroxide increased the potency of the humoral and cellular responses. In addition, when used on its own with SuHV-1, green propolis extract promoted an increment of the cellular immune response which resulted in increased protection. The use of green propolis extract as an adjuvant might contribute for the efficacy of vaccines, especially those which depend on the cellular immune response for protective response. It can also increase the potency of vaccines when associated to particulate adjuvants such as aluminum hydroxide.

Acknowledgements

We are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support; Nectar Pharmaceutical Ltda., Belo Horizonte, MG – Brazil, for supplying the propolis, and Mr José Carlos Rösler Sandrini for technical support.

References

- [1] Singh M, O'hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res* 2002;19(6):715-28.
- [2] Scott P, Trinchieri G. IL-12 as an adjuvant for cell-mediated immunity. *Immunology* 1997;9:285-91.
- [3] Barr TA, Carling J, Heath AW. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine* 2006;24:3399-407.
- [4] Leclerc C. New approaches in vaccine development. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2003;26:329-41.
- [5] Storni T, Kündig TM, Senti G, Johansen P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:333-55.
- [6] Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995;26:83-99.
- [7] Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998;36:347-63.
- [8] Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000;31:3-15.

- [9] Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999;64:235-40.
- [10] Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Méd* 2005;2(1):29-32.
- [11] Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto HL, Fujimoto T, Matsuka ML, Satoh T. Evaluation of propolis. I: Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharmaceut Bull* 1997;20(5):496-501.
- [12] 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.
- [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] Simões LM, Gregorio LE, Da Silva Filho AA, De Souza ML, Azzolini AE, Bastos JK, et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol* 2004;94:59-65.
- [15] Decastro SL, Higashi K. Effect of different formulation of propolis on mice infected with *Trypanossoma cruzi*. *J Ethnopharmacol* 1995;46:55-8.

- [16] Orsolic N, Basic I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol* 2003;84:265-73.
- [17] Scheller S, Owczarek S, Krol W, Malinowska B, Nikodemowicz E, Aleksandrowicz J. Immunisierungsversuche bei zwei fallen von alveolitis fibroticans bei abnehmender leistungsfahigkeit des immunsystems unter anwendung von propolis-athanolextrakt (EEP), esberitox N und eines calcium-magnesium-praparates (dolomit.). *Heikunst* 1989;102:249-55.
- [18] Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 2000;6(2):205-19.
- [19] Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. *Vaccine* 1992;10(12):817-23.
- [20] Piatti RM, Ikuno AA, Cunha ES, D'ambros R, Gregori F, Soares RM, et al. Characterization of Aujeszky's Disease virus isolates from south and southeast Brazil by RFLP analysis. *Braz J Microb* 2001;32:144-6.
- [21] Vidor T, Cunha AC, Guizzardi II, Salvo EO, Martins RM, Fernandes GV. Doença de Aujeszky: II. Uso do camundongo em teste de eficiência de vacina inativada. *Arq Bras Med Vet Zoot* 1991;43(5):387-96.

[22] Mayr A, Bachmann PA, Bibrack BM, Withmann G. Virologische Arbeitsmethoden - Band IV - Sicherheit bei virologischen arbeiten - Biometrische Methoden. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag, 1982.

[23] 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.

[24] 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.

[25] Curfs JHAJ, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. Clin Microbiol Rev 1997;10(4):742-80.

[26] Sá-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. J Ethnopharmacol 2003;87:93-7.

[27] Mishima S, Narita Y, Chikamatsu S, Inoh Y, Ohta S, Yoshida C, et al. Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. J Ethnopharmacol 2005;99:5-11.

[28] Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. J Ethnopharmacol 2005;98(3):301-5.

- [29] Orsolic N, Terzic S, Sver L, Basic I. Polyphenolic compounds from propolis modulate immune responses and increase host resistance to tumor cells. *Food Agric Immunol* 2005;16:165-79.
- [30] Cox JC, Coulter AR. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997;15(3):248-56.
- [31] Lindblad EB. Aluminium adjuvants – in retrospect and prospect. *Vaccine* 2004;22:3658-68.
- [32] Schlegel M, Vernazza PL. Immune response and vaccine efficiency. *Vaccine* 1998;16(13):1256.
- [33] Fan J, Nishanian P, Breen EC, McDonald M, Fahey J. Cytokine gene expression in normal human lymphocytes in response to stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(3):335-40.
- [34] Pinto RA, Arredondo SM, Bono MR, Gaggero AA, Díaz PV. T Helper 1/T Helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection as associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics* 2006;117:878-86.
- [35] Blonska M, Bronikowska G, Pietsz G, Czuba ZP, Scheller S, Krol W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2004;91:25-30.

[36] Sforcin JM, Kanero R, Funari SRC. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J Venom Anim Toxins* 2002;8(1):19-29.

[37] Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities 2001. *J Ethnopharmacol* 2001;74:105-112.

4 ARTIGO 3

Veterinary Immunology and Immunopathology, 116, p.79-84, 2007.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Veterinary Immunology and Immunopathology 116 (2007) 79–84

 Veterinary
immunology
and
immunopathology

www.elsevier.com/locate/vetimm

Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5

Geferson Fischer^{a,b,*}, Marlete Brum Cleff^b, Luana Alves Dummer^{a,b},
Niraldo Paulino^c, Amarílis Scremin Paulino^c, Camila de Oliveira Vilela^b,
Fabrício Souza Campos^b, Tiago Storch^b, Gilberto D'Avila Vargas^b,
Sílvia de Oliveira Hübner^b, Telmo Vidor^b

^a*Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPe), Campus Universitário,
Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil*

^b*Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPe, Campus Universitário,
Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil*

^c*Faculdade de Farmácia, Departamento de Pesquisa e Extensão, Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Received 19 October 2006; received in revised form 19 December 2006; accepted 9 January 2007

Abstract

Despite recent technological advances in vaccine production, most vaccines depend on the association with adjuvant substances. In this study, propolis, which has been attracting the attention of researchers due to its bioactive properties, was evaluated as an immunological adjuvant. The association of 40 mg/dose of an ethanolic extract of green propolis with an inactivated oil vaccine against bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5), resulted in a significant increase ($P < 0.01$) in the neutralizing antibody levels, comparing to the bovines that received the same vaccine without propolis. Besides, propolis increased the percentage of animals with high antibody titers (above 32). Phenolic compounds such as artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) and the derivatives of cinnamic acid besides other flavonoid substances were abundant in the propolis extract used, and they could be the main substances with adjuvant action. The effect of the green propolis extract on the humoral immune response can be exploited in the development of new vaccines.

Keywords: Green propolis; Immunological adjuvant; Antibodies; Bovines

1. Introduction

The recent progress in the development of vaccines has allowed their use not only as a prophylactic product, but also in the treatment of cancer, immunological disorders and chronic infections (Blom and Hilgers, 2004). However, many of them require association with adjuvant substances which, when combined with an antigen, increase its immunogenicity, potentiating the humoral and/or cellular immune responses (Storni et al., 2005; Barr et al., 2006). Besides, immunological adjuvants can be used to extend the duration of the immune response or to stimulate mucosal immunity (Leclerc, 2003).

Even though several substances have been evaluated regarding their adjuvant capabilities, as a general rule, production of vaccines is still dependent on the use of aluminum salts (Leclerc, 2003) or oil emulsions, specific for vaccines of veterinary use (Jansen et al., 2006). This way, the development of new vaccines will be highly benefited with the identification of new substances capable of promoting and directing to a proper immune response (Cox and Coulter, 1997; Singh and O'Hagan, 2002).

Oil adjuvants, which are no longer in use for humans due to their adverse effects (Lindblad, 2000), are still largely used in vaccines for veterinary use. These oil emulsions, used specially in association with inactivated antigens (Jansen et al., 2006), potentiate the immune system through the formation of a deposit at the inoculation site, with slow and long release of the antigen (Cox and Coulter, 1997). However, these inactivated vaccines need periodic revaccinations to produce an efficient immunological response (Fenner et al., 1993).

Propolis is a resinous material produced by bees that displays a variety of biological activities against viruses, bacteria, fungi, pathogenic protozoa, and also

tumor cells (De Castro et al., 2001). This natural product also behaves as anti-hyperalgesic and anti-inflammatory agent (De Campos et al., 1998). Despite the demonstration of its immunomodulator activities (Dimov et al., 1992; Orsi et al., 2000), many of the mechanisms of action are still unknown.

Chemical studies revealed the complex composition of propolis, with more than 300 constituents, including several bioactive phenolic compounds such as flavonoids and derivatives of hydroxycinnamic acids (Bankova et al., 2000). These constitutive characteristics can vary according to the bee species and the period of the year (Bankova, 2005). Nevertheless, the botanical origin (Bankova et al., 2000; Bankova, 2005) seems to be the most important factor to be considered when trying to explain the chemical variability among different propolis samples. Green propolis, only found in Brazil, is produced from a plant commonly known as “Alecrim do Campo” (*Baccharis dracunculifolia*). This species is not adapted to the natural conditions of other countries (Miyataka et al., 1997), which confers to the green propolis chemical and biological characteristics different from the European propolis, produced predominantly from the exudates of buds of aspen (*Populus* sp. – Bankova et al., 2000).

The aim of this work was to evaluate the adjuvant capability of a green propolis extract when associated with an inactivated oil vaccine against bovine herpesvirus type 5, through determination of neutralizing antibody titers, and characterization of the chemical composition of this extract by high performance liquid chromatography (HPLC).

2. Material and methods

2.1. *Preparation, botanical and chemical characterization of the propolis ethanolic extract*

The green propolis sample was collected in the State of Minas Gerais (South East region of Brazil) by Nectar Farmacêutica Ltda (sample number SBN-54), and stored at -20 °C. The ethanolic extract was prepared as previously described (Paulino et al., 2002). Briefly, the propolis was ground and macerated with an extract solution containing absolute ethanol, using 10 min daily agitation, for 10 days. Then, the solvent was evaporated and the resulting dried matter was dissolved in phosphate buffer solution (pH 6.2), in a final concentration of 40 mg/ml (4% w/v) and called GP1. The chemical composition of the green propolis extract was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), using a Merck-Hitachi chromatographer (Germany), equipped with the L-7100 pressure pump and the L-7455 diode array detector. Separation was carried out in a Lichrochart 125-4 (Merck, Darmstadt, Germany) column as previously described (Marcucci et al., 2001). The detection of components was monitored at 280 nm and standard compounds were co-chromatographed with the extract. Analysis of the data was carried out using the Merck-Hitachi D-7000 (Chromatography Data Station - DAD Manager).

2.2. *Vaccines and inoculations*

Evaluation of adjuvant properties of the green propolis extract was made through its association with an inactivated oil vaccine against bovine herpesvirus type 5. This virus, supplied by the Virology and Immunology Laboratory, UFPel (Pelotas – Brazil), was propagated in Madin Darby Bovine Kidney (MDBK - ATCC) cell line. After inactivation with bromoethylamine BEI ($C_2H_7Br_2N$, - Merck), in a final

concentration of 0.02 M and pH 7.5, the viral suspension with titer of 10^8 CCID₅₀/ml (cell culture infections dose 50%/ml) was emulsified in mineral oil (Marcol 52 - Esso Standart Oil Co.), together with the propolis extract.

In this study, sixty randomly selected Hereford cattle, male and female, weighting approximately 150 kg and seronegative for BoHV-5 determined by serum neutralization (House and Baker, 1971), were used. The animals were kept in pasture rotation together with other cattle of the farm. They were allocated into three groups of 20 animals (control, G1 and G2) and vaccinated intramuscularly (IM) at days 0, 30 and 60. The volume inoculated was adjusted according to the concentration of the propolis solution used per dose, varying from 3 to 5 ml, however the antigen concentration was constant in all the treatments (10^8 CCID₅₀/ml per dose). The control group received 3 ml of vaccine without propolis, the group G1 received 5 ml of the same vaccine with 20 mg/dose of propolis, whereas group G2 received 5 ml of this vaccine with 40 mg/dose of propolis. The animals were observed daily until the tenth day after each inoculation in order to observe the occurrence of adverse effects due to vaccination. The experiment was approved by the UFPel Committee of Ethics in Animal Experimentation.

2.3. Serology

For titering neutralizing antibodies against BoHV-5, individual serum samples were collected 30 days after each inoculation and stored at -20 °C. Antibodies were titered by the serum neutralization method (House and Baker, 1971). Briefly, each serum was individually diluted in logarithmic base 2 from 1:2 to 1:256. After distribution (25 µl) in quadruplicate in polystyrene plates (TPP), 25 µl of BoHV-5 virus suspension containing 100 CCID 50% was added. After incubation for 1 h at 37 °C in

an environment with 5% CO₂, approximately 30,000 MDBK cells were added per well. The microplates were then returned to the incubator until being read in an inverted microscope when the 100 CCID₅₀% was observed in the control cells. The absence of cytopathic effect was an indication of the viral neutralization by neutralizing antibodies. The antibody titer was calculated by Behrens & Kärber (Mayr et al., 1982) statistical method, and it was represented by the highest serum dilution capable of neutralizing 100 CCID 50% of the virus.

2.4. Statistical analysis

Antibody titers were compared using variance analysis (ANOVA) with repeated measurements. The LSD test was used to determine significant differences ($P < 0.05$) among the mean of each treatment using the SAS program.

3. Results

3.1. Chemical composition of the propolis extract

As can be observed in Table 1, the HPLC analysis of the green propolis sample utilized in this experiment showed high levels of the phenolic compounds 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C), 2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopiran, 3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, besides cinnamic acid and the flavonoids pinobanksin and kaempferol. In this sample of green propolis, the flavonoids corresponded to 22.37% of the dried extract.

Table 1: Chemical characterization of green propolis determined by high performance liquid chromatography - HPLC

Component identified in propolis	mg/g dry extract
2,2-Dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopiran	3.17
2,2-Dimethyl-8-prenyl-2H-1-benzopyran-6-propenoic acid	9.77
3,5-Diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (derivative 1-9)	17.75
3,5-Diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C)	27.77
3-Prenyl-4-hydroxycinnamic acid	5.71
Caffeic acid	2.43
Caffeic acid (derivative 1)	11.35
Cinnamic acid derivative	65.98
Ferulic acid	7.21
Kaempferol (derivative 1)	20.45
p-Coumaric acid	18.03
Pinobanksin	31.48
Total (mg/g of crude resin)	221.10
Total (%)	22.11

3.2. Humoral Response

In this work, the adjuvant properties of an ethanolic extract of green propolis when associated with an inactivated oil vaccine against BoHV-5 was evaluated. A dose dependent effect was demonstrated. The inclusion of 40 mg/dose of this extract in the experimental vaccine increased the humoral immune response ($P<0.01$), measured by antibodies titers, compared to the control group (vaccine without propolis) (Figure 1). Sixty days after the first inoculation, the titer increased from 35

(negative control, without propolis) to 54 in the treatment with 40 mg/dose of propolis. This difference remained the same 90 days after the first inoculation, when the antibody titers were 43 and 67, respectively. However, the addition of 20 mg/dose of the propolis extract did not result in a statistically significant alteration, when compared to the control group. Besides increasing antibody titers of cattle vaccinated with BoHV-5, the use of 40 mg/dose of green propolis solution also increased the percentage of animals with antibody titers equal or higher than 32, especially 30 days after the third vaccination (Table 2).

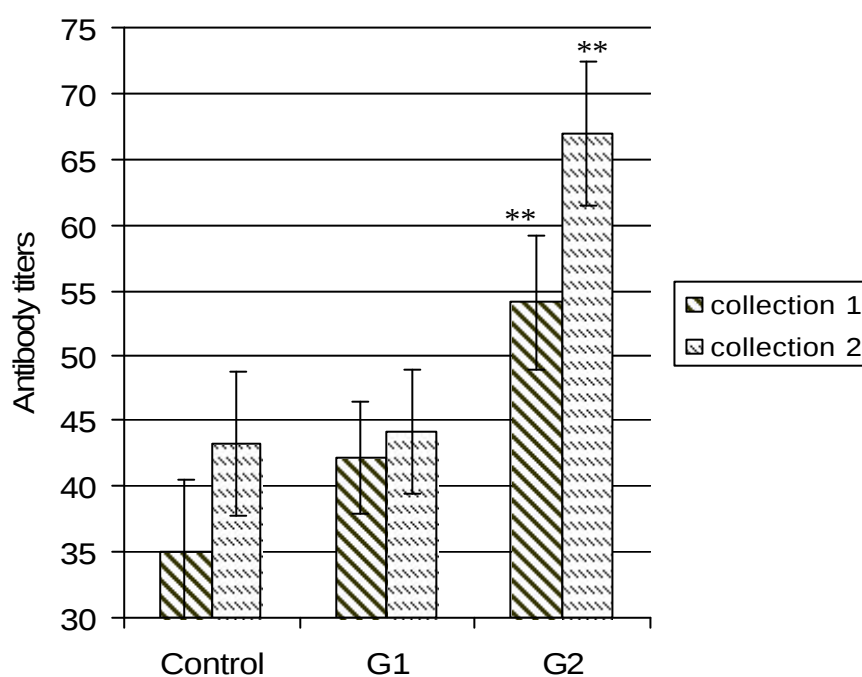


Fig 1. Mean titer $\pm$ S.E.M of neutralizing antibodies (expressed as reciprocal of the serum dilution) of cattle immunized with an inactivated oil vaccine against BoHV-5 without propolis (control), with 20 mg/dose of an ethanolic extract of green propolis (G1) or 40 mg/dose of propolis (G2). The titer was determined by the serum neutralization test, 30 days after the second inoculation (collection 1) or 30 days after the third inoculation (collection 2). ** $P < 0.01$ compared to the control group.

Table 2. Accumulated percent distribution of neutralizing antibodies titers in bovines vaccinated with BoHV-5

Titer ^a	30 days after second dose			30 days after third dose		
	Control ^b	G1 ^c	G2 ^d	Control	G1	G2
0 – 7,9	100	100	100	100	100	100
8 – 15.9	100	100	100	100	93.7	100
16 – 31.9	72.3	100	100	81.3	77.9	100
32 – 63.9	44.6	61.2	72.2	43.8	51.6	70.6
= 64	22.3	27.8	33.4	31.3	21.0	58.8

^a Titers expressed by the reciprocal

^b Vaccine without propolis

^c Vaccine with 20 mg/dose of ethanolic extract of green propolis

^d Vaccine with 40 mg/dose of ethanolic extract of green propolis

Adjuvants are used in several types of vaccine aiming at the optimization of the humoral and/or cellular responses. However many substances with adjuvant properties cannot be used in vaccines for human or veterinary use due to their adverse effects (Estrada et al., 2000). In this study, conducted in cattle, no adverse effect was observed due to the association of propolis with the oil vaccine against BoHV-5.

4. Discussion

Due to the high chemical complexity of propolis, it is extremely difficult to identify which substances are responsible for its biological activities. Some researchers state that it is indeed the heterogeneous composition, besides the

combination of natural substances that confers to propolis its bioactive properties (Kujumgiev et al., 1999; Ozkul et al., 2005). According to Sforcin et al. (2005) the action of propolis on the immunological system results from the synergism of several substances. The elements detected in the green propolis extract utilized in this experiment, determined by HPLC analysis, show that its botanical origin is the *Bacharis dracunculifolia* plant (Marcucci, 1995; Bankova et al., 2000). In a previous study, multivariate analysis associating ethanol extracts of different samples with the levels of bioactive compounds determined by HPLC allowed the typing of Brazilian propolis (Marcucci et al., 2001). The results were similar to the ones found in this experiment, with predominance of phenolic compounds and cinnamic acid derivatives. In these extracts, the flavonoids corresponded to 22.37% of the dried extract. These substances are known to stimulate humoral as well as cellular immunity (Havsteen, 2002). Although the precise mechanism of action remains unknown, it is possible that the flavonoids stimulate production of cytokines, particularly interleukin 1 (IL-1) and IL-2, which have mitogenic action for B and T lymphocytes (Havsteen, 2002). Artepilin C seems to perform its immunostimulating activity through increase in the number of auxiliar T lymphocytes (Kimoto et al., 1998).

The association of different adjuvant substances aims at combining their properties responsible for the stimulation of the immune system. Complete Freund adjuvant, for example, combines the immunomodulator properties of *Mycobacterium tuberculosis* with the activity of the oil emulsion (Cox and Coulter, 1997). In this experiment, the association of 40 mg/dose of an ethanolic extract of green propolis with an inactivated oil vaccine against BoHV-5 increased the humoral immune response ($P<0.01$), measured by neutralizing antibodies titers. It is conceivable that

the combination of oil with propolis allowed the formation of a deposit in the inoculation site, resulting in a slow and extended antigen (BoHV-5) and propolis release (Cox and Coulter, 1997), allowing a constant stimulus of the immunological system. According to Jansen et al. (2006), the continuous release of non replicative antigens results in extended humoral immunity. The propolis extract may have acted as an auxiliary adjuvant substance, potentiating the humoral response triggered by the antigen associated to the oil. According to Sforcin et al. (2005), propolis ability in modulating antibody synthesis is part of its adjuvant action. The propolis immunostimulating capacity, through an increase in the immunoglobulin levels has already been reported in patients with fibrosing alveolitis (Scheller et al. 1989).

The precise mechanism of action of propolis on cells from the immune system remains unknown (Ansorge et al., 2003). However, it is known that artepillin C, found in large scale in the green propolis sample used, acts on macrophages stimulating the production of IL-12 (Sforcin et al., 2002), which potentiates immunoglobulin production by B cells. Other phenolic compounds, such as cinnamic acid derivatives found in the propolis sample used, also induce production and releasing of cytokines like IL-1, IL-6 and IL8 by activated macrophages, stimulating antibody production (Orsolic et al., 2005). Such mechanisms can explain the increment in the humoral response observed in the present study. Another hypothesis suggests that propolis can reduce lipid peroxidation and stimulate the immune system by means of direct lymphocyte activation (Kimoto et al., 1998).

Besides increasing humoral immune response of cattle vaccinated with BoHV-5, the use of 40 mg/dose of an ethanolic green propolis extract also increased the percentage of animals with titers higher than 32 (Table 2). According to Lazarowicz et al. (1983), bovines with titer equal or higher than 32 resist challenge with field

virus. This fact is yet more relevant considering that many farmers do not use vaccines in a prophylactic way, but only after positive diagnosis of the disease in the farm, which implies the presence of the virus in the herd. Even though cellular immunity is more important in the case of BoHV primary infection, humoral immunity is more effective in preventing the resurgence of the disease, once BoHV remains latent in the animal after infection (Babiuk et al., 1996). As comparative parameter, the United States Department of Agriculture considers as immunized a herd which has 80% of vaccinated animals with titer equal or above 8 (USDA, 2005).

Due to the increase of neutralizing antibody titers, in addition to the percentage of animals with high titers, further studies in the development of this vaccine can take into consideration the possibility of increasing the interval between vaccinations, as well as decreasing the amount of antigen per dose. These approaches, besides lowering the cost of the vaccine, could allow a reduction in the handling of the animals.

5. Conclusions

The data presented in this study showed that an ethanolic extract of green propolis increased the potency of the humoral immune response in cattle when associated with an inactivated oil vaccine against BoHV-5, showing adjuvant action. Besides the increment in neutralizing antibody titers, there was an increase in the percentage of animals with titers higher than 32. Propolis compounds responsible for the immunostimulating activities have not yet been determined, but the flavonoids and other phenolic compounds, like artemillin C, found in large quantity in the sample studied, could have been the main substances with action on the immune system.

The use of ethanolic extract of green propolis can contribute for the efficacy of inactivated vaccines, acting as an immunostimulant.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support; Nectar Pharmaceutical Ltd. Belo Horizonte, MG – Brasil, (for supplying the propolis); Prof. José Vasconcelos Arnoni, for supplying the animals; Mr José Carlos Rösler Sandrini and Ms Enilda Souza de Oliveira for the technical support.

References

- 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. *Z. Naturforsch.* 58c, 580-589.
- Babiuk, L.A., Hurk, S.D.L., Tikoo, S.K., 1996. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.* 53, 31-42.
- Bankova, V.S., Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15.
- Bankova, V., 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid. Based Complement. Alternat. Méd.* 2, 29-32.

Barr, T.A., Carlring, J., Heath, A.W., 2006. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine* 24, 3399-3407.

Blom, A.G., Hilgers, L.A., 2004. The sucrose fatty acid sulphate esters as novel vaccine adjuvants: effect of the chemical composition. *Vaccine* 23, 743-754.

Cox, J.C., Coulter, A.R., 1997. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 246-256.

De Campos, R.O., Paulino, N., da Silva, C.H., Scremin, A., Calixto, J.B., 1998. Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 1187-1193.

De Castro S.L., 2001. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Ann. Rev. Biom. Sci.* 3, 49-83.

Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Popov, S., 1992. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. *Vaccine* 10, 817-823.

Estrada, A., Katselis, G.S., Laarveld, B., Barl, B., 2000. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 27-43.

Fenner, F. J., Gibbs, E. P., Murphy, F. A., Rott, R., Studert, M. J., White, D., 1993. Veterinary Virology. Academic Press, San Diego, p. 666.

Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Ther. 96, 67-202.

House, J.A., Baker, J.A., 1971. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. Cornell Vet. 61, 320-335.

Jansen, T., Hofmans, M.P.M., Theelen, M.J.G., Manders, F., Schijns, V.E.J.C., 2006. Structure and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. Vaccine 24, 5400-5405.

Kimoto, T., Arai, S., Kohguchi, M., Aga, M., Nomura, Y., Micallef, M.J., Kurin, M., Mito, K., 1998. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from brazilian propolis. Cancer Detect. Prev. 22, 506-515.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol. 64, 235-240.

Lazarowics, M., Steck, F., Ackermann, M., Kihm, U., 1983. Prüfung von zwei Impfstoffen gegen die Infektiöse Bovine Rhinotracheitis. Schweiz. Arch. Tierheilk. 125, 797-808.

Leclerc C., 2003. New approaches in vaccine development. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 329-341.

Lindblad, E.B., 2000. Freund's adjuvants. In: O'Hagan D.T. (Ed.), *Vaccine adjuvants*, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 49-63.

Marcucci, M.C., 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26, 83-99.

Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74, 105-112.

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B.M., Withmann, G., 1982. *Virologische Arbeitsmethoden - Band IV - Sicherheit bei virologischen arbeiten - Biometrische Methoden*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 666.

Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., Isobe, A., Satoh, T., 1997. Evaluation of propolis. I: Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol. Pharmaceut. Bull* 20, 496-501.

Orsi, R.O., Funari, S.R.C., Soares, A.M.V.C., Calvi, S.A., Oliveira, S.L., Sforcin, J.M., Bankova, V., 2000. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J. Venom. Anim. Toxins* 6, 205-219.

Orsolic, N., Terzic, S., Sver, L., Basic, I., 2005. Polyphenolic compounds from propolis modulate immune responses and increase host resistance to tumor cells. *Food Agric. Immunol.* 16, 165-179.

Ozkul, Y., Silici, S., Eroglu, E., 2005. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* 12, 742-747.

Paulino, N., Scremin, F.M., Raichaski, L.B., Marcucci, M.C., Scremin, A., Calixto, J.B., 2002. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea in-vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1-9.

Scheller, S., Owczarek, S., Krol, W., Malinowska, B., Nikodemowicz, E., Aleksandrowicz, J., 1989. Immunisierungsversuche bei zwei fallen von alveolitis fibroticans bei abnehmender leistungsfahigkeit des immunsystems unter anwendung von propolis-athanolextrakt (EEP), esberitox N und eines calcium-magnesium-preparates (dolomit.). *Heikunst* 102, 249-255.

Sforcin, J.M., Kanero, R., Funari, S.R.C., 2002. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. *J. Venom. Anim. Toxins* 8, 19-29.

Sforcin, J.M., Orsi, R.O., Bankova, V., 2005. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J. Ethnopharmacol.* 98, 301-305.

Singh, M., O'Hagan, D.T., 2002. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm. Res.* 19, 715-728.

Storni, T., Kündig, T.M., Senti, G., Johansen, P., 2005. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 333-355.

USDA, 2005. Animal and plant health inspection service. pp. 683-684.

5 CONCLUSÕES

- O extrato etanólico de própolis verde atuou como um modulador do sistema imunológico.
- A associação do extrato etanólico com hidróxido de alumínio ou emulsões oleosas propiciou incremento nas respostas imunes humoral e celular de camundongos e humoral de bovinos.
- Utilizado isoladamente com o antígeno, o extrato etanólico de própolis incrementou a resposta celular de camundongos e o percentual de proteção durante desafio, mas não alterou a resposta humoral.
- A própolis verde pode ser utilizada como uma substância adjuvante para vacinas inativadas.

6 REFERÊNCIAS

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. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.58c, p.580-589, 2003.

ASO, K.; KANNO, S.; TADANO, T.; SATOH, S.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n.27, p.727-730, 2004.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, v.19, p.2666-2672, 2001.

BANKOVA, V.; KRASTEVA, G.B.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; RODELLA, R.M.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.54, p.401-405, 1999.

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

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114-117, 2005.

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

BLOM, A.G., HILGERS, L.A. The sucrose fatty acid sulphate esters as novel vaccine adjuvants: effect of the chemical composition. **Vaccine**, v.23, p.743-754, 2004.

COX, J.C., COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v.15, p.246-256, 1997.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

DALSGARD, K. Saponin adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines. **Archiv für die Gesamte Virusforschung**, v.44, p.243-254, 1974.

DANTAS, A.P.; OLIVIERI, B.P.; GOMES, F.H.M.; DE CASTRO, S.L. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.187-193, 2006.

DE CASTRO, S.L.; HIGASHI K. Effect of different formulation of propolis on mice infected with *Trypanossoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.46, p.55-58, 1995.

DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. **Vaccine**, v.10, n.12, p.817-823, 1992.

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.

FLECK, J.D.; KAUFFMANN, C.; SPILKI, F.; LENCINA, C.L.; ROEHE, P.M.; GOSMANN, G. Adjuvant activity of Quillaja brasiliensis saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. **Vaccine**, v.24, p.7129-7134, 2006.

JANSEN, T.; HOFMANS, M.P.M.; THEELEN, M.J.G.; MANDERS, F.; SCHIJNS, V.E.J.C. Structure and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. **Vaccine**, v.24, p.5400-5405, 2006.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.235-240, 1999.

LECLERC, C. New approaches in vaccine development. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.26, p.329-341, 2003.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.

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

MATSUNO, T. Isolation and characterization of the tumoricidal substances from Brazilian propolis. **Honeybee Science**, n.13, p.49-54, 1992.

MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.; KADOTA, S. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemical Analysis**, n.12, p.366-373, 2001.

MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.L.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.L.; SATOH T. Evaluation of propolis. I: Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.20, n.5, p.496-501, 1997.

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.

ORSOLIC, N.; KNEZEVI, A.H.; SVER, L.; TERZI, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.307-315, 2004.

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.

PEREIRA, A.S.; PEREIRA, A.F.M.; TRUGO, L.C.; AQUINO NETO, F.R. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.58c, p.590-593, 2003.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.6, p.278-283, 2001.

SCHATZMAYR, H.G. Novas perspectivas em vacinas virais. **História. Ciências, Saúde**, v.10 (suplemento 2), p.655-669, 2003.

SHELLER, S.; OWCZAREK, S.; KROL, W.; MALINOWSKA, B.; NIKODEMOWICS, E.; ALEKSANDROWICZ, J. Immunisierungsversuche bei zwei fallen von alveolitis fibroticans bei abnehmender leistungsfähigkeit des immunsystems unter anwendung von propolis-athanolextrakt (EEP), esberitox N und eines calcium-magnesium-preparates (dolomit.). **Heikunst**, v.102, p.249-255, 1989.

SCHIJNS, V.E.J.C. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. **Current Opinion in Immunology**, n.12, p.456-463, 2000.

SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Advances in vaccine adjuvants. **Nature Biotechnology**, v.17, p.1075-1081, 1999.

SINGH, M; O'HAGAN DT. Recent advances in vaccine adjuvants. **Pharmaceutical Research**, v.19, n.6, p.715-728, 2002.

SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal of Parasitology**, v.33, p.469-478, 2003.

STORNI, T.; KÜNDIG, T.M.; SENTI, G.; JOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.333-355, 2005.

STRADIOTTI, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; PACHECO, C.G.; EIFERT, E.C.; NUNES, P.M.M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004.