

EXTRATOS VEGETAIS (*Nicotiana glauca* e *Chrysanthemum vulgare*) EM UMA VACINA CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 (BHV-5)

OTTO FELDENS¹, TELMO VIDOR², SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER³, DANIZA COELHO HALFEN⁴

RESUMO – Este trabalho analisa o efeito da adição do extrato das folhas de *Nicotiana glauca* e *Chrysanthemum vulgare* em vacina inativada contra Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) sobre a resposta imune humoral em bovinos vacinados. Duas vacinas para BHV-5 inativadas com etilenimina binária e emulsificadas com adjuvante oleoso foram produzidas a partir de uma suspensão viral com título de $10^{8.6}$ DICC₅₀/ml. Uma das vacinas (vacina B) teve a incorporação de extrato bruto das plantas *Nicotiana glauca* e *Chrysanthemum vulgare* na dose de 5mg de extrato de cada planta por dose. As vacinas foram testadas em dois grupos de 19 bovinos, vacinados com 3 doses (3ml) de cada vacina com intervalo mensal. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram determinados em diferentes intervalos após a vacinação através do teste de soroneutralização. Trinta dias após a terceira dose vacinal a vacina A induziu título médio de anticorpos de 96 e a vacina B de 80. Na análise estatística não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos induzidos pelas duas vacinas ($p>0,05$). Os resultados indicaram que a adição dos extratos destas plantas não influenciou a resposta imune humoral nesta vacina.

Palavras-chave: Herpesvírus bovino, Vírus da encefalite bovina, BHV-5, imunoestimulantes, vacina.

PLANT EXTRACTS (*Nicotiana glauca* and *Chrysanthemum vulgare*) IN A VACCINE TO BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 (BHV-5)

ABSTRACT – The effect of *Nicotiana glauca* and *Chrysanthemum vulgare* leave extracts on the humoral response in cattle vaccinated with an inactivated vaccine to bovine Herpesvirus type 5 (BHV-5) were examined. Two inactivated oil-adjuvanted BHV-5 vaccines were prepared with an infectious titre (pre-inactivation) of $10^{8.6}$ DICC/ml, inactivated with binary ethylenimine (BEI) and emulsified in oil adjuvant. *Nicotiana glauca* and *Chrysanthemum vulgare* extracts were added (5mg of each extract per dose) as a coadjuvant to one of the vaccines (vaccine B). Two groups of nineteen calves were vaccinated with 3 doses (3 ml) at four week intervals between doses. Neutralizing antibody levels in sera were determined at different time intervals after vaccination. Thirty days after the administration of the third dose the mean neutralizing antibody titre was 96 for vaccine A and 80 for vaccine B. There was no significant difference between the antibody titres induced by the two vaccines ($p>0.05$). These results indicate that extracts of these plants had no adjuvant effect on the inactivated BHV-5 vaccine.

Key words: Bovine herpesvirus, Bovine encephalitis virus, BHV-5, immunostimulants, vaccine.

¹ Méd. Vet., MSc. IAGRO Av. Senador Filinto Müller, 1146, Bairro Universitário, 79.074-460. Campo Grande, MS.

² Méd. Vet., PhD. Professor do Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel, 96010-900. Pelotas, RS

³ Méd. Vet., MSc. Professor do Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel, 96010-900. Pelotas, RS E-mail hubner@ufpel.tche.br Fax (0532) 759159. (Autor para correspondência).

⁴ Méd. Vet., MSc. Professor do Departamento de Ciências Biomédicas, UCS, 95001-970. Caxias do Sul, RS. Caixa Postal 1352

Recebido para publicação em 02/10/2000.

INTRODUÇÃO

O Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) é o agente etiológico de uma enfermidade neurológica caracterizada por meningoencefalite não supurativa, de curso geralmente fatal, que afeta principalmente bovinos jovens (FLORES et al., 1998). O Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) está associado a distúrbios respiratórios (rinotraqueíte infecciosa bovina - IBR) e reprodutivos, e possui estreita relação antigênica com BHV-5. As vacinas inativadas para BHV-1 são amplamente utilizadas em países onde o vírus é endêmico, como uma alternativa para o controle da enfermidade (DONKERGOED e BABIUK, 1991; FENNER et al., 1993). As vacinas inativadas são seguras, estáveis ao armazenamento, e não reverterem a virulência. Porém, necessitam de várias doses e do uso de adjuvantes para produzirem uma melhor resposta imunológica (FENNER et al., 1993). O uso dos adjuvantes vacinais visa compensar a perda da capacidade de replicação das amostras de vírus inativados, que resulta frequentemente numa resposta imune de curta duração. VICTORATOS et al. (1997) demonstraram que alguns adjuvantes direcionam a mudança de classe de anticorpos através da indução de diferentes tipos de citocinas. Assim, a administração de adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund, Al(OH)₃ e QuilA resulta em uma resposta imune do tipo 2 (humoral), por aumentarem a expressão dos genes para interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13). BeSO₄ aumenta produção de RNA mensageiro para IL-5 and IL-6, e lipopolissacarídeos (LPS) estimulam síntese de IL-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α); VICTORATOS et al. 1997).

A busca de vacinas inativadas que preencham os critérios desejados de uma vacina "ideal", com indução de imunidade específica eficiente e de longa duração, total

segurança, ausência de reações adversas e facilidade de administração, tem resultado na necessidade de pesquisa de melhores adjuvantes e coadjuvantes. A atividade coadjuvante ou paraimune é definida como o efeito da estimulação do sistema imune exercido por algumas substâncias (MAYR, 1986). Segundo ALKEMADE (1990) estas substâncias são fortes ativadoras dos macrófagos, incrementando a produção da interleucina 1 (IL-1), um coadjuvante natural que de forma inespecífica amplia a resposta imune a antígenos e células tumorais. A IL-1 atua como mediadora de imunidade via linfócitos T e estimula os linfócitos B para a produção de anticorpos, induz febre, aumenta a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol, ativa os fibroblastos e estimula a multiplicação de linfócitos e a liberação de IL-2 e interferon γ pelas células T CD4⁺ (ALKEMADE, 1990). Pesquisas recentes tem revelado diversos compostos vegetais com pronunciada atividade imunoestimulante. Arabinogalactanos provenientes de *Echinacea purpurea*, *Achyrocline satureoides*, *Urtica dioica* (WAGNER, 1995) e proteínas isoladas de *Cajanus indicus* promovem uma estimulação de resposta imune humoral e celular (DATTA et al., 1999). O extrato aquoso de *Piper longum* demonstrou atividade imunoestimulante específica e também inespecífica (TRIPATHI et al., 1999). No experimento conduzido por VIDOR et al (1998), a adição do extrato bruto das plantas *Nicotiana glauca* („Catinga de Mulata“) e *Chrysanthemum vulgare* („Erva Paraguaia“), demonstraram uma forte estimulação da resposta imune humoral em frangos imunizados contra a doença de Newcastle. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do extrato obtido das folhas das plantas *Nicotiana glauca* e *Chrysanthemum vulgare* adicionado a uma vacina inativada contra o Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) sobre a resposta imune humoral em bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

VÍRUS

Foi utilizada uma amostra de BHV-5 (denominada RP), isolada de surto de meningoencefalite no município de Pelotas, RS, para a produção da vacina e testes sorológicos. A multiplicação viral foi realizada em células de linhagem "Madin Darby Bovine Kidney" (MDBK). O título da suspensão de vírus foi calculado pelo método de Behrens & Kärber (MAYR et al., 1982), tomando por base a presença/ausência de efeito citopático.

VACINAS

Foi produzida com a amostra de BHV-5 uma vacina inativada com adjuvante oleoso (vacina A) e outra com adjuvante oleoso adicionada de extrato de plantas (vacina B). Após a obtenção da suspensão viral com título de 10^7 doses infectantes para cultivos celulares 50% (DICC₅₀/25 µl) foi realizada a inativação com etilenimina binária (BEI), na concentração final de 0,02 M (pH 7,8). A BEI foi obtida pela ciclização do BEA (2-bromoetilamina) a 0,2 M (0,409 g de BEA em 10 ml de água destilada) sob condições alcalinas por uma hora a 37°C. A solução alcalina utilizada para ciclização foi NaOH 0,2M. A suspensão viral com inativante foi submetida a agitação magnética durante 12 horas a temperatura ambiente, conforme descrito por BAHNEMANN et al. (1974). O controle de vírus ativo na suspensão foi realizado inoculando-se a suspensão viral tratada com BEI em cultivo de células MDBK. A BEI foi neutralizada com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) a 2%.

Na elaboração das vacinas foram utilizadas nove partes de óleo mineral e uma parte de emulsionante. Na vacina B foi adicionado extrato vegetal bruto extraído das

plantas *Chrysanthemum vulgare* e *Nicotiana glauca* na proporção de 5 mg de cada planta por dose de vacina. Ambas espécies foram coletadas no mês de novembro, período anterior a floração, no herbário (nº 20.720) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O extrato bruto foi obtido das folhas das plantas secas em estufa a 60°C durante 30 minutos. Após trituração, maceração e filtração, o extrato foi adicionado à vacina. As vacinas foram emulsionadas com emulsionador de mesa. A vacina A foi constituída de 125 ml de suspensão viral inativada de BHV-5 e 125 ml de óleo. A vacina B foi composta da mesma suspensão viral inativada emulsificada em óleo com a adição do extrato bruto de *Chrysanthemum vulgare* e *Nicotiana glauca*.

Para controle de qualidade do produto final, após emulsificada a vacina passou pelos testes da gota, condutibilidade elétrica, estabilidade da emulsão, esterilidade e inocuidade (GOTO, 1978).

EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAIS

Foram utilizados 38 bovinos do sexo feminino, com idade entre 12 e 24 meses, da raça Hereford, que pela prova de soroneutralização não apresentavam anticorpos para BHV-5. Os animais foram escolhidos ao acaso e mantidos em pastoreio rotativo. Os animais foram divididos em dois grupos de 19 bovinos cada. Um grupo foi vacinado com três doses (3 ml/dose) da vacina A e o outro grupo recebeu as mesmas doses da vacina B. Os animais foram vacinados via intramuscular profunda, com intervalo de 30 dias entre cada dose da vacina. Foram realizadas nove coletas de sangue para sorologia segundo o seguinte cronograma: dia 1 (coleta branca); 15 dias após a 1ª dose; 30 dias após a 1ª dose; 15 dias após a 2ª dose; 30 dias após a 2ª dose; 15 dias após a 3ª dose; 30 dias após a 3ª dose; 120 dias após a 3ª dose e 210 dias após a 3ª dose.

TITULAÇÃO DE ANTICORPOS

Os títulos de anticorpos produzidos após a vacinação foram determinados pelo teste de soroneutralização. A soroneutralização foi realizada com a mesma amostra de BHV-5, com título de $10^{6,50}$ DICC₅₀/25 µl. As amostras de soro foram testadas com quatro repetições, em diluições de base logarítmica 2, frente a 100 DICC₅₀/25 µl. As microplacas com a mistura soro e vírus foram incubadas por uma hora a 37°C, após o que foram adicionadas células MDBK a uma concentração de 30 000 células/50µl. Para o cálculo dos títulos de anticorpos foi usado o método de Behrendts & Kärber (MAYR et al., 1982).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi classificado como inteiramente ao acaso com parcelas divididas. A variável analisada foi a média dos títulos de anticorpos em \log_2 . Foi usado o teste F e teste de Duncan para comparar as médias das vacinas e análise de regressão polinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias dos títulos de anticorpos neutralizantes aos 15 e 30 dias após a 1ª, 2ª e 3ª dose e aos 120 e 210 dias após a 3ª dose (180 e 270 dias após a 1ª dose), nos dois grupos de animais vacinados, encontram-se na figura 1. Pode ser observado a evolução comparativa das médias dos títulos de anticorpos (recíproca de \log_2) dos animais vacinados com a vacina oleosa simples (vacina A) e vacina oleosa com extrato vegetal (vacina B). Após a 1ª dose vacinal a maioria dos animais (37/38) não produziu anticorpos detectáveis por soroneutralização. Trinta dias após a 2ª dose vacinal (dia 60 após a 1ª dose) 63% (24/38)

dos animais dos dois grupos apresentaram títulos de anticorpos superior a 1:8 (correspondente a 3 na escala logarítmica; dados não mostrados), enquanto que as titulações realizadas 30 dias após a 3ª dose vacinal mostraram que 100 % dos animais vacinados nos dois grupos apresentaram títulos acima de 1:8, quando o título médio de anticorpos induzido pela vacina A foi 96 e a vacina B foi 80.

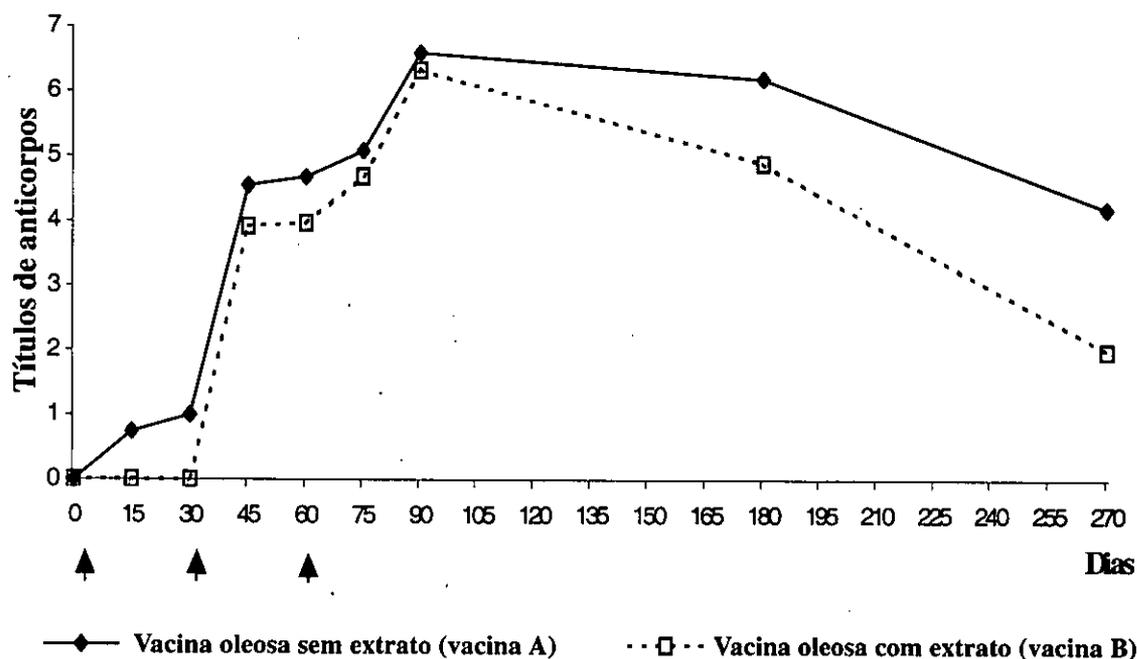
As vacinas A e B demonstraram boa eficiência na indução de síntese de anticorpos nos animais vacinados, verificada pelos títulos de anticorpos 30 dias após administração da 3ª dose. Os anticorpos sintetizados após a vacinação declinaram gradativamente. Quatro meses após aplicação da 3ª dose 81% (30/37) dos animais ainda mantinham título igual ou superior a 1:8, mas somente 24% (9/37) dos animais apresentavam este título após 7 meses. LAZAROWICZ et al. (1983), testando vacinas inativadas para IBR, observaram que a indução de anticorpos neutralizantes maior ou igual a 1:16 ocorria após uma 2ª dose, com intervalo de quatro semanas. Neste mesmo estudo, todos os animais com títulos de anticorpos iguais ou superiores a 1:8 ficaram protegidos das enfermidades ocasionadas por BHV-1 no teste de desafio. No presente trabalho, embora os animais vacinados tenham produzidos títulos médios de anticorpos superiores (96 para a vacina A e 80 para a vacina B) aos títulos obtidos por LAZAROWICZ et al. (1983), somente aos 30 dias após a terceira dose 100% dos animais apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 1:8. Portanto, com as vacinas inativadas contra BHV-5 produzidas neste estudo, para que todos animais apresentassem títulos de anticorpos maiores ou igual a 1:8, foi necessário a aplicação de três doses. Este resultado está de acordo com o estudo de SCHIPPER & KELLING (1975) que ao avaliarem bovinos vacinados com uma vacina inativada contra BHV-1 observaram que 63% (41/65) não

apresentavam título de anticorpos demonstráveis após uma segunda dose.

A presença de atividade coadjuvante em *Nicotiana glauca* e *Chrysanthemum vulgare* foi primeiramente estudada no trabalho conduzido por VIDOR et al (1998). Vacina inativada oleosa para doença de Newcastle adicionada do extrato bruto das folhas de *Nicotiana glauca* e *Chrysanthemum vulgare*, induziu níveis de anticorpos em média 3,5 vezes maiores quando comparados ao grupo vacinado com a vacina sem o extrato, uma diferença altamente significativa ($p < 0,01$) (VIDOR et al., 1998). No presente trabalho a vacina inativada para BHV-5 com extratos de *Nicotiana glauca* e *Chrysanthemum vulgare* não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) em comparação com a vacina para BHV-5 sem extrato, quanto aos níveis de

anticorpos produzidos. Como supõe-se que as substâncias paraímunes façam estimulação inespecífica, esperava-se que a resposta humoral fosse aumentada, como ocorreu com a vacina de Newcastle. Os resultados descritos por VIDOR et al. (1998) não foram repetidos neste trabalho, porém, a resposta imune celular induzida pelas vacinas não foi avaliada. A imunidade celular é muito importante na defesa contra a maioria das infecções virais, especialmente infecções por herpesvírus, onde a propagação viral ocorre célula a célula, sem o contato viral com os fluidos corporais (NATARAJ et al., 1997). Considera-se indispensável medir o estímulo da imunidade celular em outros experimentos com os extratos vegetais utilizados.

FIGURA 1 - Média dos títulos de anticorpos neutralizantes (recíproca de \log_2) dos animais vacinados com vacina oleosa e vacina oleosa com extrato vegetal. As setas indicam a primeira (dia zero), segunda (dia 30) e terceira (dia 60) dose das vacinas.



Conclui-se que as médias dos títulos de anticorpos induzidos pelas duas vacinas não apresentaram diferença estatística significativa,

não havendo, portanto, influência do extrato vegetal sobre a resposta imune humoral nas condições do presente experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKEMADE, S. J. Estudios preliminares de los efectos inmunologicos de fragmentos de pared celular de *Mycobacterium*. **11^{as} Lecturas Memoriales Bain Fallon Asociacion Veterinaria Australiana**. 1990. 16p.
- BAHNEMANN, H. G.; MELLO, P. A. de.; ABARACON, D.; GOMES, I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. **Bulletin Office International Epizooties**, v. 81, p. 1335-1343, 1974.
- DATTA, S.; SINHA, S.; BHATTACHARYYA, P. Effect of a herbal protein, Cl-1, isolated from *Cajanus indicus* on immune response of control and stressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.67, n.3, p. 259-267, 1999.
- DONKERSGOED, J. V.; BABIUK, L. A. Diagnosis and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, Lenera, v. 86, n.1, p. 86-94, 1991.
- FENNER, F. J.; GIBBS, E. P.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDERT, M. J.; WHITE, D. **Veterinary Virology**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1993. 666p.
- FLORES, E. F.; SILVA, A. M.; WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 1998. p. 127-136.
- GEORGE, L. W. Understanding the encephalitis form of the infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, Lenexa, United States. p. 335-337, 1991.
- GOTO, N. Comparative studies on effects of incomplete oil adjuvants with different physical properties. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, Tokio, v.31, p.53-79, 1978.
- LAZAROWICZ, M. V.; STECK, F.; ACKERMANN, M.; KIHM, U. Prüfung von zwei impfstoffen gegen die infectiöse bovine rhinotracheitis. **Schweiz Archives Tierheilkd**, Switzerland, v. 125, p. 797-808, 1983.
- MAYR, A.; BACHMANN, P. A.; BIBRACK, B. M.; WITHMANN, G. **Virologische arbeitsmethoden - band IV - sicherheit bei virologischen arbeiten: biometrische methoden**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1982.
- MAYR, A. Progress in the immunization and paraimmunization of comercial animals. **Praktische Tierarzt**, Hanover, v. 10, p. 865-870. 1986.
- NATARAJ, C.; EIDMANN, S.; HARIHARAN, M. J.; SUR, J. H.; PERRY, G. A.; SRIKUMARAN, S. Bovine Herpesvirus 1 Downregulates the Expression of Bovine MHC Class I Molecules. **Viral Immunology**, Nebraska, v.10, p. 21-34, 1997.
- SCHIPPER, I. A.; KELLING, C. L. Evaluation of inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Canadá, v. 39, n.4, p. 402-405, 1975.
- SOULEBOT, J. P.; GUILLEMIN, F.; BRUN, A.; DUBOURGET, P.; ESPINASSE, J. Infectious bovine rhinotracheitis: study on the experimentally induced disease and its prevention using an inactivated, adjuvant vaccine. **Development of Biological Standardization**, Switzerland, v. 52, p. 463-483, 1982.
- TRIPATHI, D. M.; GUPTA, N.; LAKSHMI, V.; SAXENA, K. C.; AGRAWAL, A. K.

- Antigiardial and immunostimulatory effect of *Piper longum* on giardiasis due to *Giardia lamblia*. **Phytotherapy Research**, United Kingdom, v. 13, n. 7, p. 561-565, 1999.
- VICTORATOS, P.; YIANGOU, M.; AVRAMIDIS, N.; HADJIPETROU, L. Regulation of cytokine gene expression by adjuvants in vivo. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.109, n. 3, p. 569-578, 1997.
- VIDOR, A. C.; JANTZEN, M. M.; PONSATI, R. VIDOR, T. Efeito imunoestimulante de moléculas vegetais. In: VII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Pelotas. **Anais...** Pelotas. 1998. p. 391.
- WAGNER, H. Immunostimulants of plant-origin. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, Croatian, v. 68, n. 3, p. 615-626, 1995.
- ZUFFA, A.; BRANYIK, A.; ZALAJ, J.; MRACEK, K. Immunization effectiveness of the inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis (IBR) with an oily adjuvant. **Veterinary Medicine**. v. 24, n.5, p. 257-268, 1979.