



## **AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CONFERIDA PELO ANTÍGENO RECOMBINANTE DE CADEIA LEVE REGULADORA DE MIOSINA EM BOVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Fasciola hepatica***

João Pedro Longo VILANI<sup>1</sup>, Lara Cristine SCHWERTZ<sup>1,2</sup>, Eduardo HILLESHEIM<sup>1,2</sup>, Anderson GRIS<sup>2</sup>, Renan Augusto CECHIN<sup>2</sup>, Kelen Regina Ascoli BALDI<sup>2</sup>, Ricardo Evandro MENDES<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC-EM

<sup>2</sup>Laboratório de Patologia Veterinária

<sup>3</sup>Orientador IFC Campus Concórdia

### **RESUMO**

Uma forma alternativa de controle da fasciolose que vem sendo estudada é o desenvolvimento de antígenos vacinais para conferir proteção aos bovinos. Este trabalho teve como objetivo determinar a resposta imune através de imunohistoquímica. Fígados de bovinos imunizados com o antígeno MRLC e seus grupos controles, experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*, foram submetidos à técnica de imunohistoquímica. Até o momento foram feitas tentativas de padronização com três anticorpos, conseguindo atingi-la somente com um deles, não havendo ainda comparações a serem feitas entre os grupos.

### **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

A fasciolose é uma enfermidade causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica*, sendo mundialmente distribuída e afetando principalmente bovinos e ovinos, resultando em perdas anuais em torno de US\$ 3 bilhões à comunidade agrícola (BORAY *et al.*, 1985). As perdas por condenação de fígado em abatedouros podem chegar a 80% em áreas endêmicas em ruminantes adultos. Para controlar e tratar os animais parasitados por *F. hepatica* é utilizado anti-helmínticos, porém estes apresentam períodos de carência longos e são proibidos para uso em animais leiteiros.

Como a *F. hepatica* tem capacidade de induzir imunidade, iniciou-se estudos para a produção de vacinas contra este trematodo, sendo atualmente testado antígenos recombinantes. O uso do antígeno recombinante da cadeia leve reguladora de miosina (MRLC) tenta mimetizar o efeito do Praziquantel, o qual atua inibindo esta cadeia da superfície do parasito, levando a ruptura do mesmo, possibilitando a ação de eosinófilos, contrações musculares e morte do trematodo (GNANASEKAR *et al.*, 2008). Foi relatado por Henker *et al.* (2017) que o antígeno



MRLC em ratos, conferiu cerca de 50% de proteção frente a fasciolose experimental.

O objetivo deste trabalho foi determinar a resposta inflamatória em fígado de bovinos imunizados com o antígeno recombinante e infectados experimentalmente com *F. hepatica*, assim como nos grupos controle através de imunohistoquímica.

### **METODOLOGIA**

Os bovinos permaneceram durante um mês nas instalações previamente ao início do experimento para aclimação. Posteriormente foram divididos em três grupos experimentais: i) imunizados com o antígeno em adjuvante e infectados; ii) imunizados com o adjuvante e infectados; iii) controle negativo infectado e não imunizado. Cada grupo foi constituído por cinco bovinos livres de qualquer patógeno. Os animais imunizados receberam três doses da vacina de 200 µg com intervalo de três semanas. E depois de um mês da terceira dose foram infectados com 200 metacercárias e eutanasiados dois meses após.

Fragmentos dos fígados dos bovinos infectados foram colhidos na necropsia e fixados em formalina 10%, processados rotineiramente, embebidos em parafina e realizados cortes histológicos em lâminas positivadas Vectabond (Vector, CA, USA) para técnica de imunohistoquímica.

Para a realização da padronização da imunohistoquímica foram seguidos os seguintes passos: retirada da parafina, reidratação, inibição da peroxidase endógena, recuperação antigênica, lavagem em TBS, aplicação de anticorpos primários, lavagem em TBS, aplicação anticorpo secundário biotinado, lavagem em TBS, revelação, lavagem em TBS, coloração de hematoxilina, lavagem, desidratação e montagem da lâmina. Após isso determina-se o número de células coradas (positivas) ao anticorpo estudado nas lâminas, tendo controles positivos e negativos como preconiza as técnicas.

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A parte da experimentação com os bovinos e avaliação dos fígados já foi realizada, com a quantificação dos parasitos e as lesões histopatológicas. No grupo



dos bovinos imunizados com o adjuvante e infectados observou-se uma média de 20 parasitos por fígado, já os imunizados com antígeno e adjuvante e infectados obtiveram média de 13 parasitos, demonstrando redução de 35% na carga parasitária. Não houve diferença com relação à quantidade de ovos entre os grupos.

A padronização da técnica de imunohistoquímica e com os anticorpos interferon, STAT e CD2, com os anticorpos secundários e kit de revelação da marca Vector, apresentaram muitas marcações inespecíficas e coloração de fundo em excesso, não sendo possível sua padronização. Para corrigir este problema foi adquirido um novo kit para revelação e anticorpos secundários da marca Dako, sendo padronizado até o momento, o anticorpo interferon, porém os demais ainda não.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como foi padronizado somente um anticorpo, o interferon, não foi possível comparar os resultados entre os grupos e avaliar a resposta inflamatória.

### REFERÊNCIAS

BORAY J. C. Parasites, Pests and Predators. In: Gaafar SM, Howard WE, Marsh E (eds), **Elsevier**. p. 179–218.1985.

GNANASEKAR M, et al. Praziquantel affects the regulatory myosin light chain of *Schistosoma mansoni*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 53 n. 3 p. 1054-1060. 2008.

HENKER, L. C. et al. Immune protection conferred by recombinant MRLC (myosin regulatory light chain) antigen in TiterMax Gold® adjuvant against experimental fasciolosis in rats. **Vaccine**, v. 35, n. 4, p. 663-671, Elsevier. 2017.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.092>.