



## **AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CONFERIDA PELO ANTIGENO RECOMBINANTE CATEPSINA L3 EM BOVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Fasciolahepatica***

**Renan Augusto CECHIN<sup>1</sup>; Anna ZAWISTOWKA-DENIZIAK<sup>2</sup>; Manoela Marchezan PIVA<sup>3</sup>; Anderson GRIS<sup>3</sup>; Kelen Regina Ascoli BALDI<sup>3</sup>; Ricardo Evandro MENDES<sup>4</sup>.**

<sup>1</sup>Bolsista PIBITI/CNPq

<sup>2</sup> Witold Stefanski Institute of Parasitology - Polish Academy of Science

<sup>3</sup>Laboratório de Patologia Veterinária IFC-Campus Concórdia.

<sup>4</sup>Orientador IFC-Campus Concórdia.

### **RESUMO**

Fasciolose é uma doença mundialmente distribuída, afeta principalmente bovinos e ovinos e é considerada uma importante enfermidade responsável por perdas econômicas. Este trabalho teve como objetivo determinar a resposta inflamatória através de imuno-histoquímica em bovinos imunizados com o antígeno recombinante e infectados experimentalmente com *Fasciola hepatica*. Os bovinos foram abatidos, fragmentos de fígado e linfonodos foram colhidos e processados rotineiramente para a técnica de imuno-histoquímica. Como ainda não foi possível terminar a padronização da técnica com os anticorpos inicialmente testados, optou-se pela aquisição de novos kits, porém os mesmos ainda não foram padronizados completamente e consequentemente não foram obtidos resultados.

### **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

Fasciolose trata-se de uma parasitose causada pela *Fasciola hepatica*, que acomete o fígado e as vias biliares de muitas espécies animais domésticos e selvagens (QUEIROZ et al., 2002). Nos bovinos e ovinos a fasciolose é uma das principais causas de prejuízos econômicos nos abatedouros, tendo em vista que o fígado de animais parasitados é descartado. No Brasil, Bennema et al. (2014) relatam prevalência média de 6,3% de fígados condenados por *Fasciola hepatica*, sendo que a maior prevalência foi encontrada no Rio grande do Sul (14,4%), seguido por Santa Catarina (4,5%). Torgerson & Claxton (1999) relatam também queda na produção e na qualidade do leite, perda de peso dos animais, queda na fertilidade, atraso no crescimento, e, ocasionando em alguns casos até mortalidade.

O uso excessivo de anti-helmínticos no controle da fasciolose aumenta o risco de resíduos desses quimioterápicos na carne e derivados lácteos, como também, aumenta a possibilidade de resistência destes parasitos aos anti-helmínticos. A imunoprofilaxia com



antígenos recombinantes para fasciolose, já vem sendo estudada há alguns anos por pesquisadores deste projeto, onde, foram obtidos resultados positivos, porém ainda insatisfatórios para produção de uma vacina comercial, na qual é esperada percentual igual ou superiores de eficácia de 80%. O objetivo desta pesquisa foi determinar a resposta inflamatória no fígado através de imuno-histoquímica em bovinos imunizados com o antígeno recombinante Catepsina L3 e infectados experimentalmente com *Fasciola hepatica*.

## METODOLOGIA

### Infecção experimental

Os bovinos permaneceram durante um mês nas instalações previamente ao início do experimento para aclimatação. 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 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 (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição temporal das imunizações, infecção e eutanásia nos diferentes grupos.

Grupo	Semana				
	1	3	9	13	21
1	Antígeno + Adjuvante	Antígeno + Adjuvante	Antígeno + Adjuvante	Infecção	Eutanásia
2	Adjuvante	Adjuvante	Adjuvante	Infecção	Eutanásia
3	-	-	-	Infecção	Eutanásia

### Estudo histopatológico

Fragmentos de fígado foram colhidos na necropsia dos bovinos na 21<sup>o</sup> semana, fixados em solução de formalina 10% durante 24 horas, processados rotineiramente, embebidos em parafina e realizados os cortes histológicos para a avaliação das lesões microscópicas, as quais foram quantificadas de 0 – 3 sendo, ausência de lesão (0), lesão leve



(1) lesão moderada (2) e lesão acentuada (3).

### **Estudo imuno-histoquímico**

Para a técnica de imuno-histoquímica, os materiais foram processados como descrito anteriormente no estudo histopatológico, porém montado em lâminas positivadas Vectabond (Vector, CA, USA). Os materiais e realização da técnica de imuno-histoquímica efetuada estão descritos abaixo:

#### **Buffers e soluções tampão**

TBS e Tris EDTA

#### **Inibição da peroxidase endógena e tratamento enzimático**

Peróxido de hidrogênio

#### **Soros imunes e reativos específicos**

Proteinase K, Protease XIV, Anticorpos específicos primários (CD2, CD4, CD8, CD68, IgG, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) – Tabela 2, Anticorpo secundário biotinado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP)

#### **Revelação**

3,3' diaminobenzidina (DAB, K3468, DakoCytomation<sup>®</sup>)

#### **Metodologia empregada**

1. Desparafinização: 2 banhos de xilol de 10 minutos cada
2. Início da reidratação: cinco banhos de 10 minutos em álcool 100° e 5 minutos cada em álcool 96°, 80° e 70°
3. Lavagem de 5 minutos em PBS
4. Recuperação antigênica: digestão enzimática Proteinase K
5. Lavagem de 5 minutos em PBS
6. Inibição da peroxidase endógena: banho de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada
7. Lavados em PBS: três lavados cada Bloqueio das reações inespecíficas: incubação em câmara úmida com leite desnatado Molico<sup>®</sup> por 10 a 20 minutos
8. Lavagem de 5 minutos em PBS
9. Aplicação anticorpos primários – Tabela 2: Incubação em câmara úmida com o anticorpo





- diluído em água ultrapura por 16 horas 4°C
10. Lavagem de 5 minutos em PBS
  11. Anticorpo secundário: incubados com anticorpo secundário ligado a estreptavidina-peroxidase por 40 minutos cada etapa em 37°C
  12. Lavagem de 5 minutos em PBS
  13. Revelação: revelação com 3,3'diaminobenzidina (DAB): 3 minutos
  14. Lavagem de 5 minutos em água destilada
  15. Coloração: banho em Hematoxilina (revelação com 3,3'diaminobenzidina) durante 2 minutos
  16. Lavagem: em água corrente
  17. Desidratação: passagem rápida em gradiente crescente de álcool (apenas para revelação com 3,3'diaminobenzidina)
  18. Montagem: aplicação de meio de montagem (revelação com 3,3'diaminobenzidina) ou meio de montagem sintético.

### **Anticorpos e diluições**

Tabela 2. Nome, diluição e fabricante dos anticorpos a serem utilizados na imuno-histoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fonte</b>
CD2	1:200	Serotec
CD4	1:50	Serotec
CD8	1:200	Serotec
CD68	1:100	Serotec
IgG	1:50	Serotec
IL-4	1:50	Novus
IFN- $\gamma$	1:50	Novus

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Quanto ao número de parasitos encontrados na necropsia, a média no grupo imunizado, com adjuvante e infectado foi de 20 parasitos recuperados na necropsia por animal. Já os animais imunizados com o antígeno em adjuvante e infectados tiveram uma média de 15 parasitos por fígado, demonstrando uma diminuição de 20% na carga parasitária com a utilização do





antígeno.

No que diz respeito à histopatologia, no grupo do adjuvante e do antígeno foram observados os maiores níveis de hiperplasia de ductos biliares e infiltrado linfoplasmocitário quando comparado aos outros grupos. Em todos os grupos observou-se leve a moderada hiperplasia de paracortical e cortical de linfonodos. No grupo do adjuvante e do antígeno, também foi observada moderada a acentuada fibrose periportal.

Por motivos de dificuldade na padronização da técnica de imuno-histoquímica, os resultados ainda não foram obtidos. O atraso se teve pela constatação da incapacidade da padronização da técnica com os kits primeiramente utilizados, dada pelas inúmeras reações inespecíficas encontradas. A partir disso, optou-se pela aquisição de novos kits, porem os mesmos ainda não foram padronizados e conseqüentemente não foram obtidos resultados.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições do presente trabalho, não foi possível determinar a resposta inflamatória nos fígados dos bovinos experimentalmente infetados, pois a técnica de imuno-histoquímica está ainda sendo padronizada.

### REFERÊNCIAS

BENNEMA S.C. et al. *Fasciola hepatica* in Bovines in Brazil: Data Availability and Spatial Distribution. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 56. Jan./Feb. 2014. <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652014000100035](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000100035)>. Acesso em: 29 ago. 2017.

QUEIROZ, V. S. et al. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). *Acta Biológica Paranaense*, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 99-111. 2002.

SILVA E, R. S. et al. Fasciolose hepática. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n.11. Jul.2008.

<[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/bZFsg7XYKOHoLIIt\\_2013-6-13-16-23-55.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/bZFsg7XYKOHoLIIt_2013-6-13-16-23-55.pdf)>. Acesso em: 02 set.2017.

