

Archives of Veterinary Science v. 8, n. 2, p. 19-25, 2003  
Printed in Brazil

ISSN: 1517-784X

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE COELHOS FRENTE A EXTRATOS  
DE LARVAS DE *Dermatobia hominis***  
(Humoral immune response of rabbits against extracts of *Dermatobia hominis* larvae)

PINTO, S.B.<sup>1</sup>; SOCCOL, V.T.<sup>2</sup>; MINOZZO, J.C.<sup>3</sup>; VALENTIM-ZABOTT, M.V.<sup>4</sup>;  
VENDRUSCOLO, E.C.<sup>4</sup>; ROCHADELLI, R.<sup>4</sup>; FREITAG, A.<sup>5</sup>; GÜETNER, C.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Docente da UFPR–Campus Palotina, Rua Pioneiro nº 2153, CEP 85950-000, Palotina, Paraná, sbenghi@bol.com.br;

<sup>2</sup>Docente da UFPR, Departamento de Patologia Básica;

<sup>3</sup>CPPI-Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos – Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – Piraquara – PR;

<sup>4</sup>Docente da UFPR - Campus Palotina;

<sup>5</sup>Técnico da UFPR – Campus Palotina.

**RESUMO** – O presente experimento teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral de coelhos frente a extrato de larvas (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) de *D. hominis*. Vinte e quatro coelhos foram imunizados com três diferentes extratos de larvas de *D. hominis*. Foram estabelecidos três grupos imunizados da seguinte forma: grupo A, com extrato solúvel; grupo B, com extrato bruto; e grupo C, com extrato solúvel e extrato bruto. Uma dose de reforço foi aplicada no 135º dia após a primeira inoculação, nos animais dos grupos A, B e C. Amostras de soro foram coletadas quinzenalmente do dia 0 aos 150 dias após a primeira imunização (DPI) para verificar a cinética de produção de anticorpos por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Anticorpos circulantes foram encontrados em níveis máximos a partir de 45 DPI. A dose de reforço induziu o aparecimento imediato de uma resposta secundária. O extrato solúvel foi mais eficaz na estimulação da resposta imune humoral de machos e fêmeas. Constatou-se diferença significativa (P<0,05) na resposta imune humoral de machos e fêmeas apenas entre os animais do tratamento B. As fêmeas do referido tratamento apresentaram níveis de anticorpos superiores aos dos machos durante todo o período experimental.

**Palavras chave:** *Dermatobia hominis*, larvas, extratos, coelhos, imunização.

**ABSTRACT** – The purpose of this research was to evaluate the humoral immune response in rabbits immunized with extracts of *D. hominis* larvae (L<sub>2</sub> and L<sub>3</sub>). Twenty four rabbits, immunized with three different larvae extracts, were studied in three groups. The immunization was carried out as following: group A, with soluble extract; group B, with raw extract; and group C, with soluble and raw extracts. In groups A, B and C a booster dose was applied on the 135<sup>th</sup> day after the first immunization. Serum samples were collected biweekly from 0 to the 150<sup>th</sup> day after the first immunization and processed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to access the antibody production kinetics. Circulating antibodies were found at maximum levels on the 45<sup>th</sup> day after the first immunization. The booster dose induced an immediate secondary response. The soluble extract was the most efficient inducer of the humoral immune response in both females and males. A significant difference (P<0.05) was observed only in the group B, where females showed higher antibody levels compared to males during all the experimental period.

**Key words:** *Dermatobia hominis*, larvae, extract, rabbits, immunization.

### Introdução

Os prejuízos econômicos causados pela dermatobiose se traduzem na perda da produção de leite e de carne, no retardo do crescimento, na pré-disposição a enfermidades

diversas e danos parciais ou totais nos couros. As grandes perdas econômicas geradas pela dermatobiose à bovinocultura da América Latina, tem despertado o interesse de pesquisadores no estudo de diferentes formas de controle. Entretanto, apesar dos estudos até

o momento realizados, os países afetados continuam usando os produtos químicos como única forma de controle (GOMES *et al.*, 1998, BARBOSA *et al.*, 2000, PINTO *et al.*, 2002a; PINTO *et al.*, 2002b).

Embora o ciclo de vida de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) esteja bem estudado, poucos dados são encontrados na literatura sobre os aspectos antigênicos deste parasito. Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar a resposta imune humoral de coelhos e bovinos imunizados e/ou infestados com larvas de *D. hominis*. Na maioria dos estudos a resposta imune dos hospedeiros foi avaliada por técnicas de imunodifusão dupla radial e de hemaglutinação passiva. Todavia, estas provas são laborosas o que dificulta seu uso para um grande número de amostras. MOTA *et al.* (1980) avaliaram, por meio das técnicas de imunodifusão dupla em gel agar (IDGA) e hemaglutinação passiva (HA) os anticorpos circulantes em coelhos imunizados com antígenos obtidos de larvas de *D. hominis*. LELLO e BOULARD (1990) e LELLO e PERAÇOLI (1993) avaliaram, por meio das técnicas de IDGA, HA, fator de inibição da migração de leucócitos e pelo ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) a resposta imune de coelhos imunizados e/ou infestados experimentalmente com larvas de *D. hominis*. FONSECA (1989) e BARBOSA *et al.* (2000) realizaram estudos para analisar, por meio de ELISA, os títulos de anticorpos de bovinos infestados experimentalmente com larvas de *D. hominis*.

O presente experimento teve como objetivo avaliar, por meio da técnica de ELISA indireto, a resposta imune humoral de coelhos frente a extratos de larvas ( $L_2$  e  $L_3$ ) de *D. hominis*.

### Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Biotério da Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina e no Laboratório de Parasitologia Animal da UFPR, no período compreendido entre janeiro 2000 a abril de 2001.

*Preparação de antígenos:* A preparação de antígenos, extratos de larvas  $L_2$  e  $L_3$  de *D.*

*hominis*, foi realizada segundo o método descrito por MOTA *et al.* (1980), com algumas modificações descritas nos itens a seguir.

Larvas  $L_2$  e  $L_3$  de *D. hominis* obtidas de bovinos naturalmente infestados foram lavadas em solução salina hipersaturada (NaCl 300g/100mL de  $H_2O$  destilada). Vinte gramas de larvas  $L_2$  e  $L_3$  (10 g de cada estágio) foram mergulhadas em frasco contendo 100 mL de solução salina tamponada (NaCl 0,15 M; fosfato de sódio monobásico 0,01 M; pH 7,2); em seguida as larvas foram trituradas em homogenizador (Virtis USA) a 20.000 rpm, durante 20 minutos. Este processo foi repetido duas vezes. O homogenato resultante foi filtrado em algodão de náilon e alíquotado em duas porções, A e B:

A porção A, num volume de 50 mL, foi submetida à sonicação (Ultrasonic Homogenizer: Cole – Parmer Instrument Co.) por 30 segundos, com intervalos de 30 segundos por quatro vezes. Após a sonicação, o material denominado de antígeno bruto, foi alíquotado e estocado a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento de sua utilização. A porção B, num volume de 50 mL, seguiu o mesmo procedimento da porção A. Após a sonicação, o material foi distribuído em tubos de centrífuga (previamente resfriados) e submetido à centrifugação (centrífuga Hermle Z 513K) a  $4^\circ\text{C}$  durante 45 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e recentrifugado como descrito anteriormente. O procedimento de centrifugação foi repetido cinco vezes. Depois da última centrifugação, o sobrenadante denominado de antígeno solúvel foi alíquotado e estocados a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento de sua utilização. A concentração de proteínas solúveis totais do antígeno bruto e do antígeno solúvel foi determinado pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

*Delineamento experimental:* Para avaliar a resposta imune humoral, por meio de ELISA indireto, extratos de larvas ( $L_2$  e  $L_3$ ) de *D. hominis* foram inoculados em 24 coelhos (12 machos e 12 fêmeas), da raça Nova Zelândia Branco, de aproximadamente dois meses de idade. Foram estabelecidos três grupos, cada um com oito animais (quatro fêmeas e quatro

machos). A técnica de ELISA indireto foi padronizada para o presente estudo e seguiu os princípios propostos por ENGVALL e PERLMANN (1972), MINOZZO (1997) e BARBOSA *et al.* (2000).

Os animais foram imunizados com 0,5 mL de antígeno, em três doses, via subcutânea, em intervalos quinzenais. O antígeno foi emulsionado em partes iguais (v/v) com adjuvante completo de Freund (primeiro inoculo) ou adjuvante incompleto de Freund (segundo, terceiro e quarto inoculo). Os animais do grupo A receberam antígeno bruto; os do grupo B receberam antígeno solúvel e os do grupo C receberam uma mistura em partes iguais (m/m) de extrato bruto e extrato solúvel. Os referidos grupos receberam aos 135 DPI uma quarta dose.

Quinzenalmente (aos 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 e 150 DPI) foi colhido sangue dos coelhos para realização do teste ELISA. Os soros foram alíquotados em tubos (0,50 mL em cada) e mantidos a -20°C até o momento de serem utilizados.

A técnica de ELISA indireto foi usada no presente trabalho para detectar, no soro de coelhos imunizados com extratos de larvas (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) de *D. hominis*, anticorpos específicos contra antígenos de larvas de *D. hominis*. A técnica de ELISA foi padronizada para o presente estudo e seguiu os princípios propostos por ENGVALL e PERLMANN (1972) e MINOZZO (1997).

**Sensibilização da placa:** Feita a dosagem de proteína pelo método de LOWRY *et al.* (1951), verificou-se que a concentração protéica do extrato solúvel de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *D. hominis* foi 8,3 mg/mL. Resultados semelhantes (8,0 mg/mL) foram encontrados por MOTA *et al.* (1980).

De posse da concentração protéica do antígeno, foi feita a diluição do mesmo em solução de "coating buffer" (tampão carbonato 0,05 M).

Trabalhou-se inicialmente com concentrações de 125 a 1000 ng de proteína por orifício. Observou-se que os valores de absorvância eram baixos em concentrações de 125 a 500 ng de proteína por orifício. Optou-se por utilizar uma concentração de 1000 ng de

proteína por orifício, nesta concentração foi possível estabelecer a melhor discriminação entre soros positivos e negativos.

A placa sensibilizada foi deixada em geladeira "over night" (17 horas).

**Primeira lavagem:** A primeira lavagem teve como finalidade remover o antígeno que não se fixou na placa. Utilizou-se a solução de lavagem (0,05% Tween-salina). A operação de lavagem foi repetida mais duas vezes.

**Bloqueio da placa:** O bloqueio da placa foi feito utilizando-se 100 µl por orifício de solução de bloqueio (caseína 2%; 0,05% tween 20; diluídas em PBS). Incubou-se a mesma em estufa (J. PROLAB Mod JP 101), a 37°C, por 60 minutos.

**Segunda lavagem:** A finalidade desta lavagem foi a de remover proteínas da solução de bloqueio que não se fixaram a placa. Procedeu-se de forma semelhante à primeira lavagem.

**Diluições dos soros:** Como fonte do primeiro anticorpo foram usados: 1) soros de coelhos imunizados com extrato bruto de larvas (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) de *D. hominis*; 2) soros de coelhos imunizados com extrato solúvel de larvas (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) de *D. hominis* e 3) soros de coelhos imunizados com extrato solúvel mais extrato bruto de larvas (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) de *D. hominis*.

Os soros foram diluídos em tampão de incubação (PBS; 0,25% caseína; 0,05% de tween 20). Os primeiros ensaios do teste de ELISA indireto foram realizados com as seguintes diluição dos soros: 1:800, 1:1600, 1:1320 e 1:6400. Na diluição de 800 vezes observou-se valores de absorvância elevados. Verificou-se nas diluições 1600, 3200, 6400 vezes diminuição dos valores de absorvância, por esta razão, optou-se por trabalhar na diluição 1:1600 µl (1 µl de soro e 1599 µl de tampão de incubação).

As amostras de soro foram examinadas em duplicatas. Depois de distribuir o soro na placa a mesma foi incubada por 60 minutos, em estufa a 37°C.

**Terceira lavagem:** Esta lavagem destinou-se à remoção de anticorpos que não se ligaram aos antígenos fixados na placa. Procedeu-se de forma semelhante à primeira lavagem, entretanto, este procedimento foi repetido seis vezes.

**Diluição do conjugado:** O segundo anticorpo a ser adicionado na placa foi imunoglobulina de carneiro anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase (Sigma Chemical Company). De forma semelhante ao soro, o conjugado foi diluído em tampão de incubação. Vários teste foram feitos para conhecer a diluição ideal do conjugado a ser utilizado nos testes.

Foram feitos testes com soros de animais imunizados e animais controles nas diluições de 800 a 6400 vezes. As placas foram sensibilizadas com 1000 ng de proteína por orifício. O conjugado foi diluído de 5000 a 10000 vezes. Verificou-se melhor discriminação entre os animais imunizados e controle na diluição do conjugado de 5000 vezes. Na diluição de 10000 vezes os valores de absorvância foram menores em relação a diluição de 5000 vezes. Desta forma, a diluição do conjugado ficou estabelecida em 1:5000 µl (tomando-se para isso 2 µl de conjugado e 10 mL de tampão de incubação).

Foi distribuído 100 µl por orifício, com exceção da primeira coluna na qual não foi colocada o conjugado. Depois da distribuição do conjugado na placa, a mesma foi incubada em estufa a 37°C, por 60 minutos.

**Quarta lavagem:** Esta lavagem, teve como objetivo a remoção de todo o conjugado que não se ligou à moléculas de anticorpos nos orifícios da placa. Procedeu-se de forma semelhante à terceira lavagem.

**Substrato:** A atividade enzimática foi revelada usando-se como substrato a solução de ortofenilenodiamino. Em cada orifício aplicou-se 100 µl do substrato (OPD) diluído em tampão de substrato (2 mg de OPD + 10,5 mL de tampão citrato pH 5,0 + 2 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Incubou-se a microplaca por 15 minutos, em temperatura ambiente, protegida da luz.

**Parada da reação:** Após 15 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5% em cada orifício.

**Leitura:** Procedeu-se a leitura da absorvância no leitor de microplaca (BIORAD Model 550) utilizando-se um filtro com comprimento de onda de 492 nm. A leitura foi realizada nos 10 minutos seguintes à parada da reação, para evitar o esmaecimento da coloração.

**Cálculo do ponto de corte do teste de ELISA:** Para a o cálculo do ponto de corte da reação foram realizadas as seguintes operações: a) foram separadas 80 amostras de soro (comprovadamente negativas para dermatobiose); b) somou-se todas as absorvâncias das placas dividindo-as por 80 para obter a média da absorvância e c) calculou-se o desvio padrão da reação utilizando-se a seguinte fórmula (SPIEGEL, 1976):

$$S = \sqrt{\sum[(\varpi_2 - \varpi)^2] / n}$$

$\sum$  = somatória

$\varpi_2$  = absorvância de cada animal

$\varpi$  = média das absorvâncias

N = número de amostras.

O ponto de corte foi a média das absorvâncias acrescida três vezes do desvio padrão (s)

Os valores de absorvância variaram de 0,000 a 0,026. Após a realização dos teste imunoenzimáticos foram considerados reagentes amostras de soros de animais que apresentaram absorvâncias (ABS) iguais ou superiores a 0,046.

**Análise dos dados:** Os dados foram avaliados aplicando-se a análise de variância e, quando necessário, o teste de Tukey ao nível de  $P < 0,05$  (VIEIRA, 1983).

### Resultados e Discussão

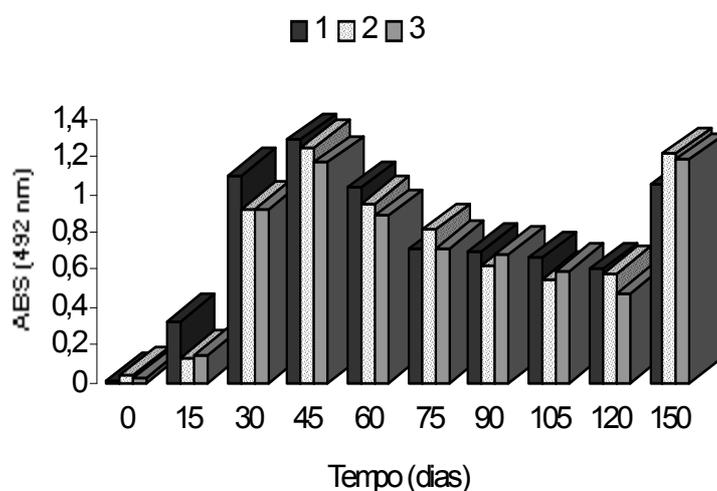
Por meio da análise de variância verificou-se que ocorreu diferença significativa [ $F_{(9; 390; 0,05)} = 23,51^*$ ] para os valores de ABS nos diferentes períodos de imunização. Pelo teste de Tukey não foi constatado diferença significativa entre os valores de absorvância observados ao longo de 150 dias para os diferentes tratamentos. A curva de distribuição dos diferentes tratamentos em relação ao tempo apresentou a mesma tendência. Constatou-se para os três protocolos de imunização e para machos e fêmeas que os anticorpos circulantes foram encontrados em níveis máximos no 45° dia após a primeira

imunização. Níveis altos de anticorpos foram mantidos até 60° dia após a primeira imunização. A partir do 75° dia os níveis de anticorpos decresceram gradativamente (FIGURA 1). Resultados semelhantes foram encontrados por MOTA *et al.* (1980), LELLO e BOULARD (1990) e LELLO e PERAÇOLI (1993).

Apesar do teste de Tukey não ter mostrado diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os valores de ABS revelados pela técnica de ELISA indireto após imunização com os diferentes antígenos, verificou-se que os animais do grupo B apresentaram ABS (0,762) mais elevada. Os animais do grupo A apresentaram média (0,695) ligeiramente superior ao do grupo C (0,645).

Verifica-se, na FIGURA 1, que a dose de reforço no 135° dia provocou o aparecimento imediato de uma resposta secundária. Atingindo níveis muito próximos aos níveis encontrados no 45° dia após a primeira imunização. Na resposta secundária, os níveis de anticorpos aumentaram rapidamente, provavelmente, as células B de memória, geradas durante a resposta primária, foram responsáveis pela cinética mais rápida.

FIGURA 1 – CINÉTICA DE ANTICORPOS, DA CLASSE IGG, DE COELHOS IMUNIZADOS COM EXTRATOS DE LARVAS DE *Dermatobia hominis*, SENDO: 1= EXTRATO SOLÚVEL; 2 = EXTRATO BRUTO; 3 = EXTRATO SOLÚVEL MAIS EXTRATO BRUTO.



A análise de variância não apresentou diferença significativa [ $F_{(2; 27; 0,05)} = 2,89^{ns}$ ] para os valores de DO verificados aos 150<sup>o</sup> dias para os diferentes tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados por MOTA *et al.*, 1980.

Os resultados encontrados indicam que os extratos obtidos de larvas de *D. hominis* foram imunogênicos para coelhos. PINTO (2001), ao estudar os aspectos histopatológicos e imunológicos da reação inflamatória em bovinos parasitados por larvas de *D. hominis*, verificou uma intensa resposta inflamatória ao redor das larvas L<sub>3</sub>. A caracterização do tipo de células envolvidas com o processo inflamatório causado por larvas de *D. hominis* e a utilização de ensaios imunoenzimáticos para avaliar a resposta imune humoral é de suma importância para avaliar melhor a resposta imunológica do hospedeiro frente às larvas de *D. hominis*.

### Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, chegou-se às seguintes conclusões:

- a) os extratos obtidos de larvas L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> de *D. hominis* foram imunogênicos para os coelhos;
- b) a cinética de aparecimento, aumento e declínio dos anticorpos circulantes e reação anamnésica nos diferentes tratamentos (extrato solúvel, extrato bruto e extrato solúvel mais bruto) foi semelhante.

### Referências

- BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A.; FREIRE, R.B. Humoral immune response in cattle experimentally infested with larvae of *Dermatobia hominis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.3, p.449-453, 2000.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.109, n.1, p.129-135, 1972.
- FONSECA, A.J.C. **Aspectos imunológicos, atividade antibacteriana e efeito de várias doses de ivermectina sobre larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae)**. Itaguaí, 1989. 23 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- GOMES, A.; HONER, M.R.; KOLLER, W.W.; SILVA, R.L. Vetores de ovos de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) na região de cerrados do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.7, n.1, p.37-40, 1998.
- JANEWAY Jr., C.A.; TRAVERS, P. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- LELLO, E.; BOULARD, C. Rabbit antibody responses to experimental infestation with *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.4, p.303-309, 1990.
- LELLO, E.; PERAÇOLI, M.T.S. Cell-mediated and humoral immune responses in immunized and/or *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.47, p.129-138, 1993.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- MINOZZO, J.C. **Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para imunodiagnóstico da cisticercose bovina**. Curitiba, 1997. 96 f. Tese (Mestrado em Patologia Veterinária) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- MOTA, N.G.S.; PERAÇOLI, M.T.S.; LELLO, E. Anticorpos circulantes em coelhos imunizados com antígenos obtidos de larvas de *Dermatobia hominis* Lin. (Diptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.32, n.4, p.453-457, 1980.
- PINTO, S.B. **Aspectos bioecológicos e imunológicos de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Oestridae)**. Curitiba, 2001. 135 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná.
- PINTO, S.B.; SOCCOL, V.T.; VENDRUSCOLO, E.; ROCHADELLI, R.; RIBEIRO, P.B.; FREITAG, A.; HENEMANN, C.; UEMURA, M. Bioecologia de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) em Palotina, Paraná, Brasil. **Ciência Rural** (Santa Maria), v.32, n.5, p.821-827, 2002a.
- PINTO, S.B.; SOCCOL, V.T.; ROCHADELLI, R.; NADRADE, R.R.; MONTANUCCI, C.R. Marcadores parasitológicos e hematológicos para a seleção de bovinos resistentes a dermatiose. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.1, p.21-25, 2002b.

Resposta imune humoral de coelhos frente a extratos de larvas de *Dermatobia hominis*

SPIEGEL, M.R. **Estatística**. São Paulo: McGraw-Hill, 1976. 580 p.

VIEIRA, S. **Introdução a bioestatística**. 2. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1983.

Recebido: 17/03/2003

Aprovado: 30/07/2003