



## AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO COM CATEPSINA L3 FRENTE À FASCIULOSE EXPERIMENTAL

### EVALUATION OF CATEPSIN L3 IMMUNIZATION AGAINST EXPERIMENTAL FASCIULOSE

Taisson Rafael MINGOTTI<sup>1</sup>, Fernanda Felicetti PEROSA<sup>1</sup>, Anna ZAWISTOWSKA-DENIZIAK<sup>2</sup>, Renan Augusto CECHIN<sup>1</sup>, Rafael André WERLANG<sup>1</sup>, Manoela Marchesan PIVA<sup>1</sup>, Ricardo FORNER<sup>1</sup> & Ricardo Evandro MENDES<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>Bolsista Edital PROPI/NIT 79/2016, FAPESC 02/2015, Laboratório Patologia Veterinária IFC-Campus Concórdia

<sup>2</sup>Polish Academy of Sciences, Laboratory of Molecular Parasitology

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

**Apoio financeiro.** FAPESC Edital 02/2015, CNPq Edital 01/2016 e PROPI Edital 79/2016.

#### RESUMO

Fasciolose acomete principalmente bovinos e ovinos e é responsável por importantes perdas econômicas. Objetivou-se testar em ratos e bovinos a proteção do antígeno recombinante Catepsina L3 frente à infecção experimental por *Fasciola hepatica*. Os ratos foram divididos nos grupos: 1) imunizados; 2) adjuvante e 3) controle. Os bovinos foram divididos nos grupos: 4) imunizados e 5) adjuvante. Avaliaram-se ovos por grama nas fezes e contagem parasitária nos ratos, ganho de peso diário e contagem parasitária nos bovinos. Observou-se baixo índice de proteção, não alcançando nível suficiente para utilização comercial do antígeno.

**Palavras-chave:** *Fasciola hepatica*; vacina; imunoprofilaxia.

#### ABSTRACT

Fasciolosis affects mainly cattle and sheep and is responsible for significant economic losses. The objective of this work was to evaluate the protection of the recombinant antigen Cathepsin L3 in rats and cattle against an experimental infection by *Fasciola hepatica*. Rats were divided into groups: 1) immunized; 2) adjuvant and 3) control. Cattle were divided into groups: 4) immunized and 5) adjuvant. Eggs per gram of feces were measured, as well parasite burden in rats. In cattle negative parameters were observed. A low protective level was identified, not enough to utilize this antigen in a commercial vaccine.

**Keywords:** *Fasciola hepatica*; vaccine; immunoprophylaxis.

#### INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Fasciolose é 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). No Brasil, as áreas mais atingidas estão localizadas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Goiás (CUNHA et al., 2007). As perdas econômicas ocasionadas pela fasciolose são principalmente pela

redução do ganho de peso e produção de leite, e na condenação dos fígados parasitados nos abatedouros. Bennema et al. (2014) relatam prevalência média de 6,3% de fígados condenados por *F. hepatica* no Brasil, sendo que as maiores prevalências foram encontradas no Rio Grande do Sul (14,4%) e Santa Catarina (4,5%). Entretanto, dependendo da região do estado, estes valores podem ser diferentes: 7,9% em prevalência (Lucca et al., 2014) e 0,5% dos diagnósticos anatomopatológicos (Carneiro et al., 2018).

A imunopfilaxia com antígenos recombinantes para fasciolose já vem sendo estudada há alguns anos por pesquisadores que fazem parte do grupo deste trabalho, onde, foram obtidos resultados positivos, porém ainda insatisfatórios para produção de uma vacina comercial. Nesta espera-se percentual de proteção igual ou superior a 80%. Esse trabalho objetivou testar em ratos e bovinos a proteção do antígeno recombinante Catepsina L3 frente a infecção experimental por *F. hepatica*.

## METODOLOGIA

### Produção do antígeno

No processo de identificação e clonagem do antígeno, o material genético (mRNA) foi isolado de estágios larvais recém desencistados de *F. hepatica* de acordo com a técnica descrita por Sambrook et al. (1989).

### Infecção experimental

**Ratos:** Permaneceram durante 3 semanas na instalação para aclimatização, posteriormente foram divididos em grupos experimentais: 1) imunizados com o antígeno em adjuvante e infectados; 2) imunizados com o adjuvante e infectados; 3) controle infectado e não imunizado. Cada grupo contou com 10 ratos livres de qualquer patógeno. Os animais imunizados receberam 3 doses de 20 µg do antígeno, nas semanas 3, 6 e 9 utilizando o adjuvante Montanide ISA 720. Após um mês da última dose foram infectados com 20 metacercárias e eutanasiados 2 meses após (Tabela 1).

**Bovinos:** Permaneceram durante um mês nas instalações previamente ao início do experimento para aclimatização, posteriormente foram divididos em dois grupos: 4) imunizados com o antígeno em adjuvante e infectados; 5) imunizados com o adjuvante e infectados. Cada grupo contou com 5 bovinos livres de qualquer patógeno. Os animais imunizados receberam 3 doses de 100 µg do antígeno, nas semanas 4, 7 e 10 utilizando o adjuvante Montanide ISA 720. Depois de um mês da última dose foram infectados com 200 metacercárias e eutanasiados 2 meses após, sendo feito uma nova pesagem no dia anterior a eutanásia (Tabela 2).

## Estudo parasitológico

Compreendeu a contagem e a dinâmica de eliminação de ovos de *F. hepatica* nas fezes dos ratos utilizando técnica de sedimentação (Dennis, Stone e Swanson). Foram coletadas semanalmente a partir da 4ª semana pós-infecção até a semana do sacrifício (Tabela 1). Para o estudo quantitativo, foram utilizadas 2 gramas de fezes homogeneizadas e diluídas em água, seguido de 3 períodos de repouso e lavagem, com posterior observação da sedimentação e determinação do OPG. Foi realizada também a contagem dos parasitos coletados na necropsia no fígado, canalículos biliares, vesícula biliar e duodeno dos ratos e bovinos.

Tabela 1: Desenho experimental nos ratos.

| Grupo | Semana |                      |   |          |                  |           |
|-------|--------|----------------------|---|----------|------------------|-----------|
|       | 3      | 6                    | 9 | 13       | 17-22            | 22        |
| 1     |        | Antígeno + Adjuvante |   | Infecção | Contagem de ovos | Eutanásia |
| 2     |        | Adjuvante            |   | Infecção | Contagem de ovos | Eutanásia |
| 3     |        | -                    |   | Infecção | Contagem de ovos | Eutanásia |

Tabela 2: Desenho experimental nos bovinos.

| Grupo | Semana  |   |                      |    |          |                     |
|-------|---------|---|----------------------|----|----------|---------------------|
|       | -1      | 4 | 7                    | 10 | 14       | 22                  |
| 4     | Pesagem |   | Antígeno + Adjuvante |    | Infecção | Pesagem e Eutanásia |
| 5     | Pesagem |   | Adjuvante            |    | Infecção | Pesagem e Eutanásia |

## Estudo estatístico

Foi considerada a diferença significativa quando o p for menor que 0,05. Para a realização da estatística foi utilizado como suporte o programa informático SPSS, Chicago, IL, EUA.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos ratos, comparando o grupo 1 (antígeno+ adjuvante) com o 2 (adjuvante) e 3 (controle), observou-se um redução de 24,2% e 48,2% respectivamente, para contagem de ovos por grama. Já para a contagem de parasitas, de 46,4% e 53,8% respectivamente (Tabela 3). Apesar dos resultados serem positivos, o valor esperado para a produção de uma vacina comercial não foi alcançado, o qual seria igual ou superior ao de 80% de proteção.

Tabela 3: Resultado OPG e número de parasitos nos ratos.

| Grupo | Média de ovos por grama de fezes |      |       |       |       |                    | Média do número de parasitas |
|-------|----------------------------------|------|-------|-------|-------|--------------------|------------------------------|
|       | Semana                           |      |       |       |       |                    | 22                           |
|       | 17                               | 18   | 19    | 20    | 21    | 22                 |                              |
| 1     | 5,7                              | 47,7 | 92,3  | 116,3 | 104,7 | 135,3 <sup>a</sup> | 3,0 <sup>a</sup>             |
| 2     | 21,3                             | 54   | 110,4 | 140,4 | 160,3 | 176,3 <sup>b</sup> | 5,6 <sup>b</sup>             |
| 3     | 28,3                             | 59,3 | 149,8 | 244,2 | 264   | 224,5 <sup>b</sup> | 6,5 <sup>c</sup>             |

Já nos bovinos, o acréscimo no ganho de peso diário e a redução no número de parasitas hepáticos observados no grupo 4 (antígeno+adjuvante), quando comparados ao grupos 5 (adjuvante), foi de 46,1% e 18,6%, respectivamente (Tabela 4). Da mesma forma que nos ratos, a proteção esperada para a produção de vacina comercial não foi alcançada, no entanto, evidenciou-se a redução no ganho de peso diário dos animais não imunizados e com maior número de parasitos no fígado, o que reforça a tese dos severos prejuízos econômicos causados pela enfermidade.

Tabela 4: Resultado ganho de peso diário e número de parasitos nos bovinos.

| Grupo   | Peso Inicial (sem. 1) | Peso Final (sem. 23) | Ganho de Peso kg/dia | Número de parasitas |
|---------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Grupo 4 | 333,2                 | 438,2                | 0,7 <sup>a</sup>     | 15,8                |
| Grupo 5 | 209,4                 | 266                  | 0,3 <sup>b</sup>     | 19,4                |

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a utilização do antígeno recombinante Catepsina L3 tem impacto positivo na imunização de ratos e bovinos infectados experimentalmente por *Fasciola hepatica*, porém ainda insatisfatórios para o âmbito de produção uma vacina comercial.

## 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. Disponível em:

<[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: 12 set. 2018.

CARNEIRO, Christofe. DOENÇAS DIAGNOSTICADAS PELO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA NO QUINQUÊNIO 2013-2017. 2018. Disponível em:

<<http://publicacoes.ifc.edu.br/index.php/BoletimDiagnostic-o-IFC-Concordia/article/view/516>>. Acesso em: 27 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.21166/bdpatvet.v2i1.516>

CUNHA F. O. V. et al. Prevalência de *Fasciola hepatica* em ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Parasitol Latinoam*, Santiago v. 62, n.3-4, p. 188-191, 2007. Disponível em:

<[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-77122007000200015&lng=es&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122007000200015&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 12 set. 2018.

LUCCA, N. J. et al. Determinação das principais parasitoses gastrointestinais em propriedades leiteiras de Concórdia, Santa Catarina. 2014. Disponível em:

<<http://mic.concordia.ifc.edu.br/wp-content/uploads/sites/30/2017/10/53af2ff3b670c60576f5c940.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2019.

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.

SAMBROOK J, FRITSCH E.F. & MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laborat.