

## AValiação DO STATUS OXIDATIVO/ANTIOXIDANTE EM GADO EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*

EDUARDA PACKOWSKI BRAGA<sup>1</sup>; LUIS PAULO HENRIQUES RODRIGUES DA  
SILVA; NATHIELI BIANCHIN BOTTARI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – dudabraaga@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – luispaulohr@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – nathieli.bottari@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A *Fasciola hepatica* é um trematódeo de corpo achatado e de aspecto foliáceo causador da fasciolose, uma zoonose transmitida através da ingestão de água ou alimentos contaminados pela sua forma metacercária (REY, 2008). A fasciolose constitui um grave problema de saúde pública humana e veterinária. Animais infectados apresentam queda na produção de carne ou leite e uma significativa apatia, acarretando uma séria deficiência na produtividade dos rebanhos e prejuízos econômicos aos produtores da comunidade agrícola (PIEDRAFITA *et al.* 2010).

No entanto, também é configurada como um problema epidemiológico alarmante, uma vez que para o completo ciclo biológico, a *F. hepatica* necessita de um hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Lymnaea*) contribuindo à manutenção da infecção em todo o mundo (NEVES, 2019). Dados epidemiológicos apontam que 2,4 milhões de pessoas são infectadas e aproximadamente 180 milhões apresentam risco (MAS-COMA *et al.* 2014).

Ao atingir seus hospedeiros vertebrados, a fasciolose gera um processo inflamatório crônico do fígado e dos ductos biliares. Um recente estudo conduzido por KAMEL *et al.* (2015), demonstrou que o estado antioxidante/oxidante é alterado em pacientes com fasciolose crônica, contribuindo diretamente com a evolução da doença, pois a migração de formas juvenis de *F. hepatica* para o fígado do hospedeiro provoca uma intensa resposta inflamatória seguida de fibrose e cirrose, contribuindo a um processo de estresse oxidativo (KOLODZIEJCZYK *et al.* 2005; BOTTARI *et al.* 2015).

Contudo, o objetivo do presente estudo foi analisar histologicamente o fígado e avaliar a ocorrência de estresse oxidativo no soro e de bovinos experimentalmente infectados por *F. hepatica*.

### 2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do estudo, foram utilizados dez bovinos da raça Holandesa (com 25 à 30 meses de idade) que passaram por um período de adaptação de 20 dias, onde foram feitos exames de hemograma e análises bioquímicas para constatar que os animais estavam saudáveis e com sorologia negativa para *F. hepatica*. Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob número de aprovação 001/2014. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos

experimentais: grupo A animais não infectados (controle negativo, n=5) e grupo B composto por cinco animais experimentalmente por *F. hepatica* (n=5, controle positivo). Para a infecção, inicialmente, um ovino foi infectado para obter ovos do parasita e suas fezes foram coletadas diretamente do reto uma vez por semana. Os ovos foram separados e mantidos a 24 °C por 10 dias, e a eclosão da massa foi induzida pela exposição à luz. Os caracóis da espécie *Pseudosuccinea columella* foram infectados com três miracídios em 3 mL de água em um poço de placa de 24 poços (Corning, Nova York, EUA). Metacercárias foram coletadas armazenadas a 4 °C por 60 dias. Antes do uso, a viabilidade das metacercárias foi estabelecida em 98%. O inóculo (doses infectantes) foi composto por 200 metacercárias viáveis e mantido em temperatura ambiente por 24 h antes da infecção oral. Oitenta dias pós infecção (PI) uma coleta de sangue por punção venosa jugular para avaliar as variáveis do estresse oxidativo foram executadas. Após, os animais foram abatidos sob inspeção estadual, onde amostras de fígado foram coletadas para análises histopatológicas. Em soro marcadores de estresse oxidativo como a peroxidação lipídica (OHKAWA *et al.* (1979) e os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2007), atividades das enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) conforme AEBI (1984) e glutathiona peroxidase e redutase (GPx e GR respectivamente) (PAGLIA and VALENTINE, 1967) foram examinados. Os resultados foram expressos como U DC/F mL para níveis de ERO e nM MD/ mL para TBARS, U CAT/mg proteína ; U SOD/ mg proteína, nM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína para GPx e GR.

A análise estatística dos dados foi realizada em *software* GraphPad prism através do teste t de Student. Os dados foram apresentados na forma de média ± desvio padrão. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram uma média de 20 *F. hepática* adulta no fígado dos animais do grupo B. Além disso, a análise histopatológica demonstrou fibrosa moderada composta por abundante infiltrado de macrófagos contendo pigmento marrom, linfócitos, plasmócitos e fibrose em fígado. As vias biliares apresentavam acentuada hiperplasia associada à fibrose, e infiltração inflamatória de eosinófilos, linfócitos e plasmócitos nos espaços portais.

Em 80 dias pós infecção (PI), o conteúdo de espécies reativas ao oxigênio (EROs) em soro foi menor ( $274.5 \pm 59.5$ ) no grupo não infectado quando comparado ao grupo infectado ( $745.1 \pm 149.3$ )  $p < 0.01$ . De forma semelhante, a peroxidação lipídica foi menor no grupo não infectado ( $45.0 \pm 5.3$ ) comparado ao grupo infectado ( $58.1 \pm 9.4$ )  $p < 0.05$ .

Adicionalmente, enzimas antioxidantes em 100 dias pós infecção (PI) em fígado de bovino infectado por *F. hepatica*, obtiveram diferença na atividade de GPx que foi menor ( $2.02 \pm 0.84$ ) no grupo não infectado quando comparado ao grupo infectado ( $6.25 \pm 1.68$ )  $p < 0.001$ . Semelhante ao conteúdo de EROs ( $794.31 \pm 78.9$ ) no grupo não infectado quando comparado ao grupo infectado ( $1404.04 \pm 187.6$ )  $p < 0.001$  e de TBARS foi menor no grupo não infectado ( $7.37 \pm 0.97$ ) comparado ao grupo infectado ( $12.09 \pm 1.78$ )  $p < 0.001$ . No entanto, todas as atividades de CAT, SOD e GR respectivamente quando comparado o grupo não infectado ao grupo infectado obtiveram resultados  $p > 0.05$ .

As lesões ocorrem como consequência da destruição tecidual causada por secreções tóxicas produzidas pelas larvas, causando uma hiperplasia multifocal do ducto biliar. Além disso, a presença da *F. hepatica* nos ductos provoca alterações nos hepatócitos, como a produção de espécies reativas do oxigênio que é desencadeada durante o curso da infecção. Segundo, LUSHCHAK (2011) o estresse oxidativo parece estar associado a uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, como catalase e a glutatona S-transferase, por serem avaliadas e responsáveis por remover o excesso de EROs o que contribui para o dano oxidativo e manifestações clínicas da doença.

#### 4. CONCLUSÕES

Juntos, os resultados deste estudo permitiram evidenciar que a persistência crônica de *F. hepatica* no fígado de animais infectados induz um desequilíbrio oxidativo marcado por aumento de espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica de membrana e aumento das defesas antioxidantes contribuindo para o estresse oxidativo e os danos hepáticos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DA SILVA, A. S., MATHEUS D. BALDISSERA, M. D., BOTTARI, N. B., RHODEN, L. A., PIVA, M. M., CHRIST, R., STEDILLE, F. A., GRIS, A., MORSCH, V. M., SCHETINGER, M. R. and MENDES R. E. Oxidative stress and changes in adenosine deaminase activity of cattle experimentally infected by *Fasciola hepatica*, **Parasitology**, v.144, published online by Cambridge University Press, n.4, p. 520–526, 2017.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

PIEDRAFITA, D., SPITHILL, T. W., SMITH, R. E. and RAADSMA, H. W. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. **Parasite Immunology** 32, p. 572–581, 2010.

NEVES, D. P. e NETO, J. B. B. Atlas didático de parasitologia, Rio de Janeiro: Atheneu; 3ª ed. 2019.

MAS-COMA, S., BARGUES, M. D. and VALERO, M. A. Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: update for the present global scenario. **Parasitology** 141, p. 1918–1946, 2014.

KAMEL, H. H., SARHAN, R. M. and SAAD, G. A. Biochemical assessment of oxidative stress versus liver enzymes in patients with chronic fascioliasis. **Journal of Parasitic Diseases** 39, p. 628–633, 2015.

KOŁODZIEJCZYK, L., SIEMIENIUK, E. and SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidant potential of rat liver in experimental infection with *Fasciola hepatica*. **Parasitology Research** 96, p. 367–372, 2005.

KOŁODZIEJCZYK, L., SIEMIENIUK, E. and SKRZYDLEWSKA, E. Fasciola hepatica: effects on the antioxidant properties and lipid peroxidation of rat serum. **Experimental Parasitology** 113, p. 43–48, 2006.

KOŁODZIEJCZYK, L., LASZCZYNSKA, M., MASIUK, M., GRABOWSKA, M. and SKRZYDLEWSKA, E. Immunoexpression of intermediate filaments and morphological changes in the liver and bile ducts of rats infected with Fasciola hepatica. **Biotechnic and Histochemistry** 90, p. 477–485, 2005.

BOTTARI, N. B., MENDES, R. E., BALDISSERA, M. D., BOCHI, G. V., MORESCO, R. N., SCHETINGER, M. R., CHRIST, R., GHELLER, L., MARQUES, E. J. and DA SILVA, A. S. Relation between iron metabolism and antioxidants enzymes and  $\delta$ -ALA-D activity in rats experimentally infected by Fasciola hepatica. **Experimental Parasitology** 165, p. 58–63, 2016.

OHKAWA, H., OHISHI, N. and YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, p. 351–358, 1979.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, p. 1–543, 2007.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology** 105, p. 121–126, 1984.

PAGLIA, D. E. and VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 70, p. 158–169, 1967.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology** 101, p. 13–30, 2011.