

# ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA *in vitro* DE LECTINAS VEGETAIS EM ESTÁGIOS IMATUROS DE *Haemonchus contortus*

Adelino Carneiro Silva<sup>1</sup>; Breno Reinaldo Oliveira<sup>2</sup>; Janaelia Ferreira Vasconcelos Rodrigues<sup>3</sup>; Luiz da Silva Vieira<sup>1,4</sup>; Jomar Patrício Monteiro<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú, CCAB, UVA; E-mail: [adelinoifce@gmail.com](mailto:adelinoifce@gmail.com)

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário INTA, UNINTA; [brenoreinaldo1@gmail.com](mailto:brenoreinaldo1@gmail.com)

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, PPMPP, UFPR; [janaeliafv@gmail.com](mailto:janaeliafv@gmail.com)

<sup>4</sup>Docente/Pesquisador, EMBRAPA Caprinos e Ovinos; [luiz.vieira@embrapa.br](mailto:luiz.vieira@embrapa.br)

<sup>5</sup>Docente/Pesquisador/Orientador, EMBRAPA Caprinos e Ovinos; [jomar.monteiro@embrapa.br](mailto:jomar.monteiro@embrapa.br)

**Resumo:** Atualmente há uma constante busca por métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Lectinas vegetais são substâncias que exercem diversas funções nas plantas que as produzem e constituem uma fonte ampla e promissora de alternativas aos diversos problemas enfrentados na agropecuária. Diante disso, o objetivo da execução desse trabalho foi avaliar a atividade anti-helmíntica de duas lectinas, Con-A e Con-Br, em estágios larvais de *Haemonchus contortus*. Foram realizados testes *in vitro* (teste de eclodibilidade de ovos e teste de desenvolvimento larvar) com diferentes concentrações dessas lectinas em duas populações de *H. contortus*. As concentrações utilizadas não produziram efeito significativos sobre os ovos, contudo o desenvolvimento larvar dos dois isolados de nematoides foi inibido por ambas as lectinas. Apesar dos resultados mostrarem que as lectinas têm ação de inibição de desenvolvimento larvar nos nematoides, é necessário realizar novos testes para obter dados mais consistentes sobre a sua eficácia.

**Palavras-chave:** Biotecnologia; nematoides gastrintestinais; pequenos ruminantes.

## INTRODUÇÃO E OBJETIVO

A produção de pequenos ruminantes é uma importante atividade pecuária no estado do Ceará, contando com expressivos rebanhos de caprinos e ovinos, 1.180.288 e 2.545.649 animais, respectivamente (IBGE, 2022). O parasitismo por nematoides gastrintestinais (NG) é um dos principais fatores limitantes da produção desses animais (Souza-Neto *et al.*, 2017) e o seu controle depende, em grande parte, do uso de drogas anti-helmínticas. Apesar da amplitude e segurança desses medicamentos, sua utilização desencadeia o surgimento da resistência anti-helmíntica (RAH) nas populações de nematoides (Gilleard *et al.*, 2021).

Os sistemas de produção que utilizam somente anti-helmínticos sintéticos como forma de controle intensificam o processo de RAH, o qual pode inviabilizar a cadeia produtiva (Chagas *et al.*, 2022). *Haemonchus contortus* é um importante NG de pequenos ruminantes, hematófago e amplamente distribuído no mundo (Hoberg; Zarlenga, 2016). A utilização de substâncias e métodos de controle alternativo ao uso de drogas sintéticas contra as infecções por NG é uma das vertentes de pesquisas recentes (Frota *et al.*, 2023).

Lectinas vegetais são proteínas ou glicoproteínas bioativas produzidas por uma grande variedade de espécies. Essas substâncias são caracterizadas por interagir especificamente com carboidratos e exercer funções em importantes processos vitais das plantas (Mishra *et al.*, 2019). Por exemplo, as lectinas possuem a capacidade de atuar nos mecanismos de defesa contra doenças causadas por fungos e outros patógenos. Muitas dessas substâncias, inclusive de plantas de ocorrência na região de Caatinga, possuem função hemaglutinante e recebem a

denominação genérica de hemaglutininas (Arcoverde *et al.*, 2014). Essas moléculas constituem uma fonte ampla e promissora de alternativas aos diversos problemas enfrentados na agropecuária e para saúde humana (Dias *et al.*, 2015). Diante da hipótese de obter eficácia com a utilização dessas substâncias no controle de NG, o objetivo da execução desse trabalho foi avaliar a atividade anti-helmíntica das lectinas de *Canavalia ensiformis* concanavalina A (Con-A) e *Canavalia brasiliensis* concanavalina Br (Con-Br) em estágios larvais de *H. contortus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de parasitologia da EMBRAPA Caprinos e Ovinos. Todos os procedimentos envolvendo animais foram autorizados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA da EMBRAPA Caprinos e Ovinos, sob protocolo N° 004/2018.

As lectinas Con-A e Con-Br foram purificadas no laboratório de bioquímica e biologia molecular da Universidade Federal do Ceará – UFC e doadas para a realização desse experimento.

Foram utilizadas duas populações de NG. Uma população de campo, denominada nesse trabalho de nematoides nativos (NAT), foi obtida de um rebanho de conservação de raças localmente adaptadas de caprinos da EMBRAPA Caprinos e Ovinos localizada na cidade de Sobral, Ceará. A segunda amostra foi obtida a partir de infecção experimental com um isolado de *H. contortus* sensível a anti-helmínticos (ISE). As amostras de parasitos foram coletadas a partir de fezes diretamente da ampola retal dos animais e recuperadas pela técnica de recuperação de ovos das fezes. Os testes *in vitro* realizados para avaliação da atividade anti-helmíntica das lectinas foram o teste de eclodibilidade de ovos (TEO) e o teste de desenvolvimento larvar (TDL). A recuperação de ovos, TEO e TDL foram delineados de acordo com as recomendações da Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (WAAVP) ambos descritos a seguir (Coles *et al.*, 1992; 2006).

Para cada amostra, um *pool* de fezes para recuperação dos ovos de NG foi macerado e filtrado, com o auxílio de água, por uma peneira de malha de 1 mm de abertura. O material filtrado foi coletado e passou pelo mesmo processo em mais duas peneiras (105 e 55  $\mu$ m). Os ovos e o material resultante da última filtragem foram retidos na malha de uma peneira de 38  $\mu$ m, descartando-se o líquido filtrado. O material retido foi transferido para tubos tipo *falcon* de 50 mL, preenchidos com água até 35 mL e centrifugados por 15 minutos a 2500 x g em 27 °C. Após descarte do líquido sobrenadante foram adicionados aproximadamente 35 mL de solução saturada de sacarose (1 g de sacarose para 0,72 mL água destilada) em cada tubo, agitados para dissolução dos pellets e centrifugados novamente nas mesmas configurações anteriores. O sobrenadante foi lavado com solução de NaCl na peneira de 38  $\mu$ m para remoção da solução saturada de sacarose e obtenção dos ovos retidos na malha.

Os TEOs e os TDLs foram montados em placas de 24 poços. No TEO, foram adicionados em cada poço 250  $\mu$ L da solução contendo aproximadamente 100 ovos/100  $\mu$ L e 250  $\mu$ L de solução tratamento para um volume final de 500  $\mu$ L. As lectinas Con-A e Con-BR foram diluídas em água destilada e testadas nas concentrações de 0,122 a 500  $\mu$ g/mL em diluições seriadas de 4 vezes com seis repetições cada. Como controle positivo foi utilizado tiabendazol na concentração 0,025 mg/mL diluído em DMSO a 0,3% e DMSO a 0,3% como controle negativo, ambos também com seis repetições. As placas foram incubadas a 27 $\pm$ 1 °C por 48 horas e após isso, os ovos e larvas de primeiro estágio (L1) foram contados em microscópio invertido.

Os TDLs foram preparados adicionando-se em cada poço 170  $\mu$ L da solução de ovos ( $\pm$  150 ovos por poço). Após isso as placas foram incubadas por 24 horas a 27 $\pm$ 1 °C para eclosão das larvas. Decorridas as 24 horas, foram adicionados 80  $\mu$ L de meio nutritivo (*Escherichia coli* liofilizada, extrato de levedura e anfotericina B) e 250  $\mu$ L das soluções tratamentos. As

lectinas foram diluídas com o meio nutritivo e utilizadas nas concentrações de 7,8, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 µg/mL. Como controle positivo foi utilizada ivermectina na concentração de 0,008 µg/mL e água destilada como controle negativo. Após adição dos tratamentos as placas voltaram a ser incubadas para um total de sete dias nas mesmas condições anteriores. Ao fim do período de sete dias, as larvas de terceiro estágio (L3) de cada poço foram contadas em microscópio invertido.

As eficácias dos tratamentos por poço nos TEOs foram calculadas usando a seguinte fórmula: (número de ovos/número de ovos + número de larvas L1) x 100.

As eficácias dos tratamentos por poço nos TDLs foram calculadas usando a seguinte fórmula: (Média das L3 do controle negativo – número de L3 do tratamento/média das L3 do controle negativo) x 100.

As concentrações efetivas para inibir 50% (CE<sub>50</sub>) e 95% (CE<sub>95</sub>) da eclosão de ovos e do desenvolvimento de larvas foram calculadas após transformação logarítmica usando análise de regressão não linear (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações das lectinas Con-A e Con-Br testadas nesse estudo não foram capazes de evitar que as larvas de *H. contortus* eclodissem dos ovos. Nenhum efeito significativo foi observado contra o isolado ISE, que é sensível a tratamentos anti-helmínticos ou para o isolado resistente NAT. Resultado semelhante havia sido demonstrado por Batista *et al.* (2018), avaliando o efeito de Con-Br sobre ovos de *H. contortus*, estudo em que não foi observado efeito na eclodibilidade das larvas dos ovos na concentração de 1.200 µg/ml.

Nos TDLs as lectinas foram capazes de impedir o desenvolvimento das larvas. As concentrações efetivas de Con-A para inibir 50% (EC<sub>50</sub>) do desenvolvimento larvar de *H. contortus* suscetível (ISE) e resistente a anti-helmínticos (NAT), foram respectivamente, de 125 µg/ml e de 116 µg/ml. Já a EC<sub>50</sub> de Con-Br no desenvolvimento larvar do isolado sensível ISE foi de 39,40 µg/ml e de 97,92 µg/ml para o isolado resistente NAT. Na figura 1 estão demonstradas as curvas de regressão não linear de EC<sub>50</sub> das duas lectinas para os dois isolados de nematoides utilizados nesse estudo.

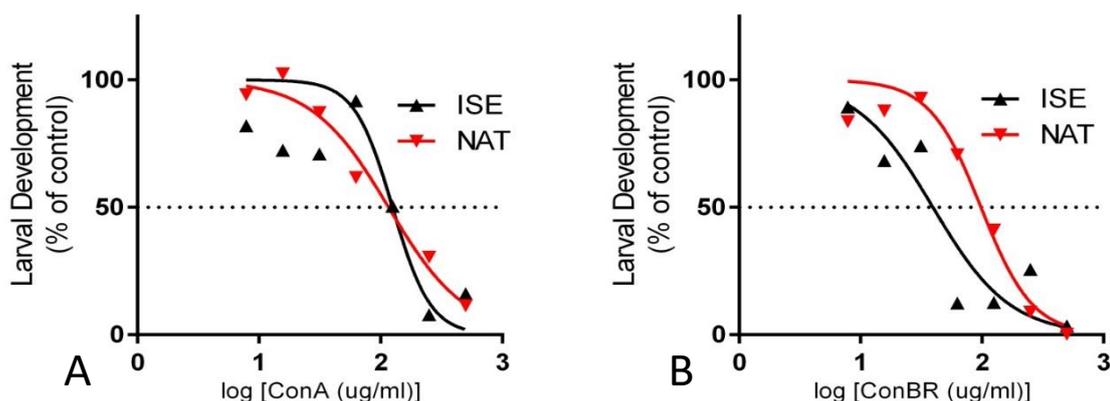


Figura 1. Curva de regressão não-linear do teste de desenvolvimento larvar (TDL) para Con-A (painel A) e Con-Br (painel B) em isolados de *H. contortus* susceptível ISE e resistente NAT a anti-helmínticos. Painel A R<sup>2</sup> ISE 0,48; R<sup>2</sup> NAT 0,67. Painel B R<sup>2</sup> ISE 0,71; R<sup>2</sup> NAT 0,81

Os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) nos TDLs para as duas lectinas foram relativamente baixos. Isso implica em uma dificuldade em associar os resultados à obtenção da concentração de dose-resposta dos nematoides às lectinas. A lectina Con-A ainda não havia sido testada para avaliar o desenvolvimento larvar de *H. contortus*. No entanto, essa lectina já

foi testada para avaliar a inibição da alimentação de estágios larvais do parasita por Álvarez *et al.* (2012), que, em nematoides não classificados quanto à sensibilidade a anti-helmínticos, foi identificada uma EC<sub>50</sub> de inibição da alimentação de 58,7 ± 11,9 µg/ml.

A ação de Con-Br sobre o desenvolvimento larvar de *H. contortus* foi avaliada por Batista *et al.* (2018), estudo no qual foi mostrado que essa lectina tem ação inibitória significativa no desenvolvimento larvar dos nematoides, demonstrado pela EC<sub>50</sub> de 260 µg/ml. Essa concentração se aproxima das encontradas nesse trabalho.

## CONCLUSÃO

Con-A e Con-Br, nas concentrações testadas nesse estudo, foram ineficazes para inibir a eclodibilidade das larvas dos ovos de *H. contortus*. O desenvolvimento larvar dos nematoides pode ser inibido pela ação das lectinas utilizadas nesse estudo em concentrações razoáveis.

É necessário realizar outros testes com essas lectinas como possibilidade de obter resultados mais consistentes.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP e à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

## REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, L. R. *et al.* *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. **Veterinary Parasitology**, [online], v.186, p. 390-398, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22130336/> Acesso em: 10 out. 2023.

ARCOVERDE, J. H. V. *et al.* Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, [online], v. 28, n. 16, p. 1297–1301, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.900497> Acesso em: 10 out. 2023.

BATISTA, K. L. R. *et al.* Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, [online], v.225, p.67-72, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166685118300860?via%3Dihub> Acesso em: 12 out. 2023.

COLES G. C. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, [online], v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1441190/> Acesso em: 11 out. 2013.

COLES G. C. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, [online], v. 136, p. 167-185, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16427201/>. Acesso em: 10 out. 2023.

CHAGAS, A. C. S. *et al.* Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 1-10, jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022044> Acesso em: 10 out. 2023.

DIAS, R. O. *et al.* Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, p. 519-541, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6272381/> Acesso em: 10 out. 2023.

FROTA, G. A. *et al.* Biological activity of cinnamaldehyde, citronellal, geraniol and anacardic acid on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 1-11, abr/jun 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023027> Acesso em: 10 out. 2023.

GILLEARD J. S. *et al.* A journey through 50 years of research relevant to the control of gastrointestinal nematodes in ruminant livestock and thoughts on future directions. **International Journal for Parasitology**, [online], v. 51, p. 1133-1151, nov. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075192100309X> Acesso e: 10 out. 2023

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2022, Tabela 3939. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em 10 de out. 2023.

HOBERG, E.P.; ZARLENGA, D.S. Evolution and biogeography of *Haemonchus contortus*: linking faunal dynamics in space and time. **Advances in Parasitology**, [online], v. 93, p. 1-30, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065308X16300215?via%3Dihub> Acesso em: 10 out. 2023

MISHRA, A. *et al.* Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, [online], v. 134, p. 1-17, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827> Acesso em: 10 out. 2023.

SOUZA NETO, F. E. *et al.* Quitosana fúngica sobre larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.84, n. e0542015, p. 1-5, out. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/5rzKfrGP7nQdd936xWK4fgw/?lang=pt&gt;>. Acesso em: 10 out. 2023.