

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE OVOS DE *Fasciola hepatica* AO TRICLABENDAZOL POR MEIO DO TESTE DE ECOLOSÃO DE OVOS

LUIZA MARQUES DE ARAUJO¹; ALLISON CARLOS ASSUNÇÃO SILVA²;
CAROLINE CARAPINA DA SILVA³; NATÁLIA BERNE PINTO⁴; MARIA
ELIZABETH AIRES BERNE⁵; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – luizaaraaujo202@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – allison.silva@ifac.edu

³Universidade Federal de Pelotas – carapina7@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – nbernevet@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Fasciola hepatica* é um parasito da classe Trematoda que causa a doença conhecida como fasciolose. Doença infecciosa essa, que apresenta grande importância veterinária devido ao seu grande impacto econômico (SILVA, 2008), decorrente de diversas perdas, tais como, redução na fertilidade e peso dos animais, menor qualidade da lã, reduzida qualidade do leite e seus derivados e, principalmente, a condenação dos fígados dos animais (MENDES, 2006).

O ciclo reprodutivo da *F. hepatica* requer dois hospedeiros: caramujo *Lymnaea*, hospedeiro intermediário, e o hospedeiro definitivo, que pode ser de diversas espécies de vertebrados, inclusive o homem - hospedeiro accidental (TOSTES et al., 2004). A fasciolose afeta o fígado, se aloja nos ductos, especialmente nos de ovinos, caprinos, bovinos e suínos. Estes animais são infectados ao ingerir água ou vegetação próxima a fonte de água contaminada pela forma infectante do parasito (LEVY, 2015).

A fasciolose é uma das principais doenças em bovinos e ovinos, no homem embora seja menos severa, ainda assim é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doença tropical negligenciada, emergente e grave problema de saúde pública em alguns países (OLIVEIRA & RESENDE, 2017).

No Brasil, sabe-se que as áreas mais atingidas pela fasciolose estão localizadas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (ECHEVARRIA, 2004). Na Bolívia, a porcentagem anual da mortalidade de ovinos está entre 15% e 25% (OLIVEIRA, 2008). Estima-se que a perda econômica mundial seja em torno de 3 bilhões de dólares ao ano (PARKINSON, 2007).

Na literatura já há relatos de parasitos resistentes ao albendazol, que é um anti-helmíntico utilizado no tratamento da fasciolose (ARAFA, 2015). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de resistência de ovos de *F. hepatica* ao Triclabendazol, por meio da teste de eclosão de ovos.

2. METODOLOGIA

Para o ensaio *in vitro*, coletou-se em diferentes períodos (Abril e Agosto de 2018), por meio de dissecação, *F. hepatica* de fígado bovino fresco fornecido por frigorífico de Pelotas – RS. Os parasitos foram mantidos em solução fisiológica durante 24 horas. No dia seguinte, os ovos foram coletados com o auxílio de um tamis de quatro malhas, onde na última os ovos ficaram retidos, os quais foram transferidos para bêquer e armazenados sob refrigeração.

Em uma placa de 6 poços, foi adicionado 1000 μ L de ovos, 30 μ L de Triclabendazol e 4.970 μ L de água, no controle negativo não houve adição desse composto, sendo o volume final ajustado por meio da adição de água. Os testes foram realizados em triplicata, tendo como controle negativo a água e como controle positivo o Triclabendazol 0,025mg/mL.

Teve-se como concentração final (na placa) 0,125 μ g/mL para o controle positivo (Triclabendazol) utilizado durante os ensaios no presente estudo.

Após essa etapa, as placas foram envolvidas em papel alumínio e levadas a estufa (28°C e 80% de umidade) por 15 dias. Decorrido esse prazo, as mesmas foram expostas à luz durante 15 minutos e por fim realizada a contagem de ovos (não embrionados, embrionados e eclodidos) utilizando microscópio invertido. Os percentuais de desenvolvimento e eclosão foram realizados de acordo o descrito por Arafa et al. (2015).

Os resultados foram tabulados em software para análise estatística e submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida por teste Tukey para diferenciar os grupos, considerando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 2.681 ovos foram utilizados, os quais encontram-se distribuídos entre os controles positivos e negativos, das diferentes datas de coleta.

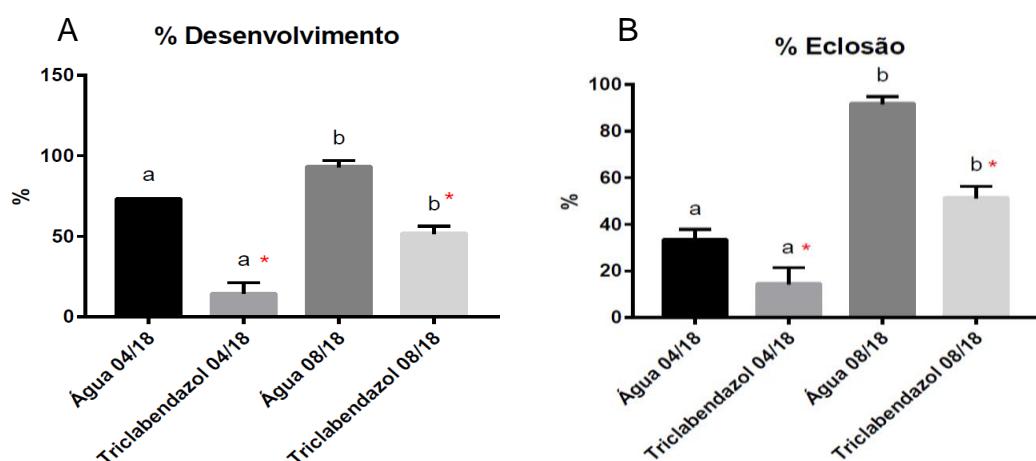


Gráfico 01: Porcentagem de desenvolvimento (A) e de eclosão (B) de ovos de *Fasciola hepática* coletados em diferentes períodos. Análise estatística realizada no Software GraphPad Prism 7.0, letras iguais representam diferença estatisticamente significativa dentro de um mesmo período de coleta e, asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre controles positivos de testes diferentes ($p < 0,05$).

Por meio da análise do percentual de desenvolvimento (gráfico 01), foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre água e o Triclabendazol em ambas datas de coleta, o que mostra que esse anti-helmíntico foi capaz de reduzir os ovos desenvolvidos (eclodidos e embrionados). Em paralelo, pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre o Triclabendazol dos diferentes testes, apontando que a atividade do composto utilizado no teste com ovos coletados em 04/18 foi mais efetiva, o que sugere resistência por parte desses ovos, visto que a concentração do composto foi a mesma utilizada em ambos testes.

Para o percentual de eclosão, em ambos testes houve diferença estatisticamente significativa entre a água e o Triclabendazol, o que aponta que o

mesmo, quando presente, é capaz de reduzir a eclosão de ovos de *F. hepatica*. Novamente é possível observar diferença estatisticamente significativa entre o Triclabendazol de ambos os testes. Em estudo similar realizado por Robles-Pérez et al. (2014) também foi possível aferir a presença de ovos de *F. hepatica* resistentes utilizando-se informações obtidas da porcentagem de eclosão e de desenvolvimento.

Diferentes pesquisadores têm relatado aumento na prevalência da resistência anti-helmíntica da *F. hepatica* devido a uso excessivo de drogas; no entanto, os mecanismos envolvidos não são bem compreendidos (ROBLES-PÉREZ et al., 2014). O Triclabendazol é o único fármaco que mata a *F. hepatica* nas suas formas imatura e adulta, contudo, a ampla resistência a essa droga pode comprometer o controle dessa infecção (KELLEY et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos testes *in vitro* foram estatisticamente significativos e apontam para a resistência de ovos de *F. hepatica* coletados em Agosto (08/18) ao Triclabendazol na concentração de 0,125µg/mL. Tendo em vista que a fasciolose é uma doença negligenciada, pesquisas como essa são importantes para apontar a presença de resistência em uma dada localidade, bem como para indicar a necessidade do desenvolvimento de novos anti-helmínticos, sendo esse é o objetivo da próxima etapa do estudo aqui relatado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SILVA, E,R,V. FASCILOSE HEPÁTICA. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.6, n. 11, 2008.
- PARKINSON, M. O'NEILL, S,M. DALTON, J,P. Controlling fasciolosis in the Bolivian Altiplano. **Trends in parasitology**, Bolivia, v.23, n.6, p.238-239, 2007
- MENDES, E, A. **Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagui (Callithrix penicillata) e gerbil (Meriones unguiculatus)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Programa de pós graduação em parasitologia, Universidade federal de Minas Gerais.
- LEVY, S; MATEUS, T.L; VIEIRA-PINTO, M. **Fasciolose**. Agronegocios.eu, Portugal. Acessado em 22 ago. 2018. Online. Disponível em: <http://www.agronegocios.eu/noticias/fasciolose/>
- OLIVEIRA, E.; MACEDO, É.; MACEDO, N. **Fasciolose**. MilkPoint. Acessado em 22 ago, 2018. Online. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao/fasciolose-50500n.aspx>
- ECHEVARRIA, F. Fasciolose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p. 100-102, 2004.

OLIVEIRA, D.M; RESENDE, P.O. *Fasciola hepatica: ecologia e trajetória histórico-geográfica pelo Brasil.* **Estcien.** Macapá, v.7, n.2, p.09-19, 2017.

KELLEY, J.M; ELLIOTT, T.P; BEDDOE, T.; ANDERSON, G.; SKUCE, P.; SPITHILL, T.W. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. **Trends in Parasitology.** Amsterdã, V.10, 2016.

PÉREZ, D.R.; PÉREZ, J.M.M.; VÁZQUEZ, F.A.R.; VALLADARES, M.M. Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. **Veterinary Parasitology.** Amsterdã, v.203, p.217-221, 2014.