

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AÇÃO OVICIDA DO ALBENDAZOL EM *Fasciola hepatica* DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS: AVALIAÇÃO *in vivo* E *in vitro*

Isabela Queiroz Takahashi¹, Amanda Martins Figueiredo de Almeida¹, Ana Clara Boechat Nunes¹, Letícia Gomes Maciel¹, Natânia do Carmo Sperandio², Isabella Vilhena Freire Martins¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, s/n, caixa postal 16, Guararema, CEP – 29.500-00 – Alegre – ES, Brasil, isabela.takahashi@edu.ufes.br, amanda.m.almeida@edu.ufes.br, ana.cb.nunes@edu.ufes.br, leticia.maciell@edu.ufes.br, ivfmartins@gmail.com.

²Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n - Campus Universitário, CEP – 36570-900 – Viçosa – MG, Brasil, natania.sperandio@ufv.br.

Resumo

O trematódeo *Fasciola hepatica* é responsável por ocasionar a enfermidade conhecida como fasciolose. Sua patogenia envolve o acometimento do fígado e ductos biliares, resultando em grandes perdas econômicas. Dessa forma, a efetividade de formas de controle do parasito vem sendo estudadas, principalmente o uso de fármacos como o albendazol, um fármaco comercial que atua como anti-helmíntico de ação adulticida e ovicida. O estudo teve como objetivo avaliar *in vivo* e *in vitro* o tratamento ovicida com albendazol em bovinos infectados naturalmente por *F. hepatica*. Amostras de fezes foram submetidas a técnica de sedimentação e os animais positivos foram tratados com sulfóxido de albendazol, na dose de 5mg/kg, contido após 21 dias do tratamento, um novo exame mostrou que os animais ainda apresentavam-se positivos. Os ovos foram recolhidos e colocados B.O.D., e após o período de 14 dias houve exposição à luz incandescente para verificar se houve eclosão de miracídios. Foi observada a ausência de formação de miracídios, o que indica que o tratamento obteve efeito ovicida e influenciou no embrionamento dos ovos de *F. hepatica*.

Palavras-chave: Fasciolose. Albendazol. Atividade ovicida.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

A fasciolose é uma enfermidade de caráter zoonótico causada pelo trematódeo do gênero *Fasciola*, e as espécies *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* (TAHA; EL-SHAikh; AL-SADI, 2014) apresentam relevância para saúde e economia, uma vez que promove danos na produção (MARTINS *et al.*, 2012) causando prejuízos devido à diminuição do rendimento animal, perda da produtividade, descarte das vísceras em abatedouros (FREITAS, *et al.*, 2014).

O ciclo dessa doença envolve um hospedeiro intermediário (HI), sendo os moluscos da Família Lymnaeidae e em um hospedeiro definitivo (HD), principalmente bovinos e ovinos (GOMES, 2012; SILVA; SANTOS, 2016). A fasciolose é extensivamente distribuída no Brasil e Martins *et al.* (2014), sugerem que sua dispersão pode estar atribuída também à transferência de animais de regiões enzoóticas com *F. hepatica* para regiões em que não há a presença desse parasito.

O controle dessa enfermidade pode ser realizado de diversas formas, sendo que o mais usado é o controle no HD com o uso de fármacos adulticidas. Além disso, também podem ser usadas substâncias que inviabilizam o desenvolvimento dos ovos, uma vez que a forma adulta da *F. hepatica* pode expelir em torno de três a sete mil ovos por dia e permanecer até dois anos nos ductos biliares (BECK, 1993).

Os medicamentos de escolha para tratamento englobam o grupo dos benzimidazóis, como o albendazol, e outros como nitroxinil, closantel, clorsulon e rafoxanida, os quais atuam no tratamento da fasciolose, agindo em diferentes fases de vida do trematódeo, sendo que a maioria apresenta apenas ação adulticida (FAIRWEATHER *et al.*, 2012; ALEMU, 2019). Contudo, alguns fármacos são difíceis de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

serem encontrados no mercado brasileiro e além disso, há relatos de resistência, como retratam Fairweather *et al.* (2012) em relação ao triclabendazol.

O albendazol é um fármaco ovicida disponível no mercado brasileiro com papel importante no controle da fasciolose, apresentando ação endoparasiticida que possui atividade sobre nematódeos gastrointestinais e pulmonares, cestódeos e trematódeos. Segundo Rinaldi *et al.* (2009) o albendazol tem capacidade de penetração em ovos de helmintos, impedindo a divisão celular e comprometendo a formação miracidial. No Brasil, está disponível para bovinos de forma injetável, como sulfóxido de albendazole ou em formulação oral, como albendazol (DE LEÃO, 2012). Entretanto, fenômenos de resistência a essa molécula foram descritos por Vara-Del-Rio *et al.*, (2006) e Elitok *et al.*, (2006), tendo em vista o uso indiscriminado, subdosagem e falta de alternância os fatores relacionados ao quadro de resistência (CHAVEZ *et al.* 2012, DE LEÃO, 2012).

Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar *in vivo* e *in vitro* o tratamento ovicida do albendazol em bovinos naturalmente infectados da Área Experimental de Rive, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no município de Alegre, Espírito Santo, Brasil.

Metodologia

Os protocolos utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) de Alegre (UFES) sob o número 027/2019. Foram coletadas amostras de fezes de 17 bovinos adultos, e processadas conforme a técnica de sedimentação descrita por Foreyt (FOREYT, 2005) para ovos de *F. hepatica*.

Das amostras coletadas, foram retiradas alíquotas de cinco gramas, e em seguida homogeneizadas a 200 mL de água, sendo posteriormente filtradas com auxílio de gaze e sedimentadas em cálices de decantação durante 10 minutos. Após a decantação, descartou-se cerca de 70% do sobrenadante, repetindo-se esse passo por três a quatro vezes a fim de se obter um sobrenadante translúcido. Após o descarte do último sobrenadante, o sedimento foi corado com o corante azul de metileno e em seguida foi feita a análise em microscópio estereoscópio para a identificação e contagem dos ovos nas amostras positivas.

Deste grupo amostral, os animais que estavam positivos ao exame foram tratados com Sulfóxido de albendazol (Agebendazol 15%® Agener União), com a dose indicada em bula de 5mg/kg, sendo 1,3 mL a cada 44 kg de peso vivo, com volume final calculado mediante ao peso do animal, via intramuscular. Após 21 dias da aplicação, foi feita uma nova coleta de fezes e pesquisa coproparasitológica de ovos de *F. hepatica*, com o objetivo de constatar a eficiência do fármaco neste tratamento.

As amostras fecais dos animais ainda positivos após o tratamento foram diluídas em água destilada e decantadas em cálices de sedimentação, sendo realizado o descarte do sobrenadante até que o conteúdo estivesse límpido. Em seguida, o sedimento com os ovos de *F. hepatica* foi distribuído em placas de cultura tipo ELISA, com 24 poços contendo água destilada. Também foi criado um grupo controle positivo com 100 ovos sabidamente viáveis do trematoda. Em seguida, a placa foi coberta com plástico de parafina (Parafilm M®) e levada para uma estufa do tipo B.O.D por 14 dias a uma temperatura de 25°C, como preconiza Fairweather *et al.* (2012).

Após esse período, a placa foi exposta a luz incandescente de 100 W durante três horas, sendo feita a observação a cada hora, de forma que os ovos foram pipetados e dispostos em lâminas cobertos com lamínula, sendo observados em microscópio óptico, conforme metodologia de Fairweather *et al.* (2012), com a finalidade de verificar a eclosão dos miracídeos.

Os dados foram compilados e analisados descritivamente para avaliação da atividade *in vivo* e *in vitro* do albendazol.

Resultados

Dos 17 bovinos avaliados inicialmente, 5 (29,41%), estavam positivos para ovos de *F. hepatica* ao exame de sedimentação, conforme descrito na tabela 1. Foi constatado um resultado insatisfatório na aplicação de Sulfóxido de albendazol, pois após 21 dias do tratamento, as amostras de fezes dos animais foram diagnosticadas novamente positivas para *F. hepática*. Realizando um comparativo entre

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

o número de ovos encontrados nas amostras antes e depois do tratamento, a média de ovos foi maior no após, devido à ausência de atividade *in vivo*, levando a um resultado insatisfatório neste.

Tabela 1 - Número de ovos de *Fasciola hepatica* antes e após o tratamento com Sulfóxido de albendazol em bovinos naturalmente infectados.

Identificação	Número de ovos antes do tratamento	Número de ovos após o tratamento
Animal 1 - Fêmea	5 ovos	4 ovos
Animal 2 - Macho	3 ovos	36 ovos
Animal 3 - Fêmea	2 ovos	14 ovos
Animal 4 - Fêmea	8 ovos	69 ovos
Animal 5 - Fêmea	3 ovos	13 ovos

Fonte: Os autores.

A partir da sedimentação das amostras oriundas dos animais ainda positivos após o tratamento, foi possível resgatar um total de 60 ovos, analisados quanto à viabilidade, testando-os sob exposição à luz para verificar a capacidade de desenvolvimento embrionário e formação miracidial. Após o período de 14 dias de incubação e exposição à luz, a análise mostrou que todos os 60 ovos não evoluíram do estágio inicial de embrionamento e consequentemente não houve a formação de miracídeos, como demonstrado na figura 1 (A). No grupo controle, observou-se a eclosão de 83% dos ovos, tendo sido possível observar miracídeos livres, como visto na figura 1 (B) e ovos operculados.

Figura 1 - A - Ovos de *Fasciola hepatica* embrionados encontrados no grupo tratado. B - miracídio eclodido de ovo do grupo controle. Aumento de 20x no microscópio óptico.



Fonte: Os autores.

Discussão

As recomendações da WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) para avaliação de eficácia de tratamento e detecção de resistência anti-helmíntica de *F. hepatica* indicam o uso dos testes *in vivo* e *in vitro* (WOOD, 1995). Neste estudo a atividade do tratamento com sulfóxido de albendazol *in vivo* não foi satisfatória, uma vez que os animais testados continuaram

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

positivos para *F. hepatica* após o tratamento, inclusive com maior liberação de ovos em relação à antes do tratamento. De Leão (2012) avaliaram a eficácia do sulfóxido de albendazole em *F. hepatica in vivo* e encontraram eficácia de 78,65% e Babjak et al. (2021) avaliaram o albendazol *in vivo* e confirmaram a redução de 77 a 81,8%, resultados diferentes desse estudo, entretanto segundo os guias de eficácia de antiparasitários da WAAVP (Wood et al., 1995), é considerado satisfatória a eficácia de 90% para trematódeos, entretanto, não há um teste padronizado para avaliação de redução de OPG para fasciolose.

Pesquisas atuais relatam que estatisticamente, eficácias de 71 a 90% podem ser consideradas suficientes para drogas como albendazol e mesmo que o percentual não ultrapasse 90%, há uma eficácia satisfatória na redução da carga parasitária (FAIRWEATHER, THREADGOLD; HANNA, 2021). Segundo Fairweather (2012), existem diversas razões que justificam a resistência parasitária de *F. hepatica* aos medicamentos, como produtos com a validade vencida, redução do metabolismo individual do animal, entre outros fatores. Mezo et al. (2008) relatam que essa resistência é advinda do uso indiscriminado, falta de monitoramento quanto à eficácia e subdosagem.

Neste estudo a atividade ovicida foi comprovada após o teste *in vitro*. Outros estudos comprovam também está atividade como Alvarez (2009), que avaliou o efeito ovicida do albendazol *in vitro* e confirmou 100% de eficácia do princípio ativo na inibição do desenvolvimento dos ovos de *F. hepatica*, o que também corrobora com o presente estudo, tendo em vista que os ovos estavam inviáveis. Arruda (2022) também avaliou a eficácia do albendazol em inibir o desenvolvimento de ovos de *F. hepatica*, sendo constatado *in vitro* que não houve resistência, uma vez que tiveram um claro efeito inibitório nos ovos, possuindo excelente atividade ovicida, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Ademais, comprovou-se ação do fármaco em outros trabalhos ao analisarem que não houve formação miracidial nos ovos e com isso, tem-se o impedimento da continuidade do ciclo biológico de *F. hepatica* (ALVAREZ et al., 2009; CANEVARI et al., 2014).

Canevari et al. (2014) encontraram eficácia *in vitro* do albendazol em diferentes localidades, demonstrando atividade menor que 13,4% em determinadas localidades e atividade maior que 70,3% em outros, apresentando que há diferenças de ação do fármaco decorrentes de fatores climáticos, sazonais e epidemiológicos; e acrescentam que o teste de eclosão de ovos pode ser um método adequado para a detecção de resistência de albendazol em *F. hepatica*.

Diante dos resultados expostos e por meio da análise dos dados obtidos, é possível confirmar que o albendazol apresentou atividade ovicida *in vitro*, uma vez que embora os animais ainda tenham apresentado ovos nas fezes após o tratamento, estes estavam inviáveis, sendo está comprovada pela inibição do desenvolvimento miracidial de *F. hepatica*.

Conclusão

O estudo provou que o albendazol se mostrou eficaz em sua capacidade anti-helmíntica com ação ovicida comprovada após a realização do teste *in vitro*.

Referências

ALEMU, B. Bovine fasciolosis in Ethiopia - A review. **Journal of Veterinary and Animal Research**, v. 2, n. 2, p. 1-11, 2019.

ALVAREZ, L., et al. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 211-216, 2009.

ARRUDA, P. M. **Avaliação da atividade ovicida de diferentes fármacos em ovos de *Fasciola hepatica* coletados de bovinos naturalmente infectados no Planalto Serrano em Santa Catarina, Brasil**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2022.

BABJÁK, M., et al. Assessing the Efficacy of Albendazole against *Fasciola hepatica* in Naturally Infected Cattle by *in vivo* and *in vitro* Methods. **Veterinary Sciences**, n. 8, p. 249, 2021.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

BECK, A. A. H. **Fasciolose**. A Hora Veterinária, n. 75, p. 65-70, 1993.

CANEVARI, J. *et al.* Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. **Journal of Helminthology**, v. 88, n. 3, p. 286–292, 2014.

CHAVEZ, A. V. *et al.* Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú. **Revista Investigación Medicina Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 90-97, 2012.

DE LEÃO, A. G.C. *et al.* Eficácia do albendazole, sulfóxido de albendazole e do clorsulon no controle da fasciolose em bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 1, p. 11-14, 2012.

ELITOK, B. *et al.* Ensaio de campo sobre a eficácia comparativa de quatro fasciolicidas contra a infecção natural por *Fasciola hepatica* em bovinos. **Veterinary Parasitology**, n. 135, p. 279-285, 2006.

FAIRWEATHER, I. *et al.* Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3, p. 249- 259, 2012.

FAIRWEATHER, I.; THREADGOLD, L. T.; HANNA. E. B. **Fasciolosis**. 2ª ed. 757 Ontario: CABI Publishing, p. 65-68, 2021.

FOREYT, W. J. Diagnostic parasitology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 19, p. 979, 2005.

FREITAS, D. F. *et al.* Bioclimatic distribution and prevalence maps for *Fasciola hepatica* in Espírito Santo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, p. 1- 11, 2014.

GOMES, C. A. V. C. **Fasciolose em bovinos de engorda**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária). Orientador: Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro. 105p. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012.

MARTINS, I. V. F. *et al.* Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3, p. 87-93, 2012.

MARTINS, I. V. F. *et al.* Distribution of bovine fasciolosis and identification of associated factors in the south of the state of Espírito Santo, Brazil: anupdate. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 23-29, 2014.

MEZO, M., *et al.* Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 235-243, 2008.

RINALDI, G. *et al.* RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, n. 2, p.118-126, 2009.

SILVA, A. A.; SANTOS, R. S. Fatores que determinam a ocorrência de *Fasciola Hepatica* em propriedades leiteiras no município de Brazópolis no estado de Minas Gerais. **Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá**, v. 3, n. 2, p. 1-3, 2016.

TAHA, H. A.; EL-SHAikh, A.; AL-SADI, M. M. Effect of sodium hypochlorite on *Fasciola gigantica* eggs and the intermediate host, *Lymnaea natalensis*: A scanning electron microscopy study. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, n. 2, p. 75-83, 2014.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

VARA DEL-RIO, M. P., *et al.* Prevalência de fasciolose ovina e estudos de resistência a fasciolícidas na província de-León. In: Vinte anos de Buiatria: **Anais do XIV Congresso Internacional da Federação Mediterrânea de Saúde e Produção de Ruminantes**. Lugo, Espanha, p. 523-529, 2006.

WOOD, I. B. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, p. 181–213, 1995.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pelo espaço e suporte técnico destinado ao desenvolvimento deste trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).