

CARACTERIZAÇÃO E MONITORAMENTO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE OVOS DE *Fasciola hepatica* IN VITRO.

Ana Clara Boechat Nunes¹, Letícia Gomes Maciel¹, Poliana Demuner Pereira², Natânia do Carmo Sperandio³, Isabella Vilhena Freire Martins¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo / Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, s/n, caixa postal 16, Guararema, - 29.500-000, Alegre - ES, Brasil, ana.cb.nunes@edu.ufes.br, leticia.maciel@edu.ufes.br, isabella.martins@ufes.br.

²Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Biológicas, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - 31270-901, Belo Horizonte - MG, Brasil, demuner.poliana@gmail.com.

³Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-graduação, Av. P H Rolfs, s/n, Campus Universitário - 36570-900 - Viçosa - MG, Brasil, natania.sperandio@ufv.br.

Resumo

A fasciolose é uma doença zoonótica causada pelo trematoda *Fasciola hepatica*, um parasito de fígado que acomete preferencialmente ruminantes. O presente estudo buscou descrever o desenvolvimento embrionário de ovos deste parasito, descrevendo sua morfologia. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ovos foram coletados diretamente da bile de animais positivos em abatedouro, posteriormente incubados por 14 dias em uma estufa do tipo B.O.D, observados diariamente. Os resultados mostraram que o desenvolvimento inicial dos ovos aconteceu após o quarto dia de incubação, com a formação dos miracídios acontecendo ao décimo dia. Ademais, as eclosões miracidiais não aconteceram de maneira simultânea, o que reforça a complexidade e importância do estudo do ciclo do parasito para o controle da doença. Na literatura pesquisada não foi encontrado algum estudo que caracterize e descreva cada fase do desenvolvimento de ovos de *Fasciola hepatica*, sendo portanto, este o primeiro registro sobre o tema.

Palavras-chave: Fasciolose. Embrionamento. Miracídio.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

O trematoda *Fasciola hepatica*, pertence ao filo Platyhelminthes, possui um ciclo heteroxênico, sendo um helminto de grande importância sanitária e econômica (Oliveira e Rezende, 2017). A doença causada por este parasito, a fasciolose, acomete principalmente mamíferos herbívoros ocasionando lesões no fígado e ductos biliares, tendo como consequência o acometimento produtivo desses animais como a diminuição do ganho de peso e na produção de leite (Charlier *et al.*, 2014; Sperandio, 2022).

O ciclo de vida do parasito consiste na eliminação de ovos nas fezes do hospedeiro definitivo, que quando eclodidos, dão origem aos miracídios, que em seguida infectam os hospedeiros intermediários, os moluscos da espécie *Pseudosuccinea columella*, onde acontece o desenvolvimento dos estágios de esporocisto, rédia e cercária. Após a saída da cercária do caramujo, esta se fixa na vegetação próxima aos leitos de água, evoluindo para a forma de metacercária, sendo esta a forma infectante para os hospedeiros definidos. Ao infectar o animal, o parasito passa pelas formas de jovem e adulto chegando até o fígado e ductos biliares (Oliveira e Rezende, 2017).

Para Martins e Sperandio (2024), a fasciolose tem como principais hospedeiros no Brasil, os ruminantes, sendo que casos em bovinos já foram relatados em todos os estados das regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Apesar da maior parte dos registros serem em bovinos, é importante destacar que em áreas endêmicas da doença nos animais, as condições podem ser favoráveis para a doença em humanos (Aleixo *et al.*, 2015). O diagnóstico da doença é realizado através da visualização dos ovos através de exames coproparasitológicos de sedimentação das fezes e para isso é necessário um conhecimento básico sobre a morfologia dos ovos de *F. hepatica*. Segundo Andrews *et al.* (2021), alguns fatores físico químicos, como a temperatura, umidade e tensão de oxigênio podem influenciar no embrionamento dos ovos e, portanto, em sua morfologia. Esse pressuposto reforça ainda mais a necessidade do conhecimento detalhado dessa fase de vida do parasito.

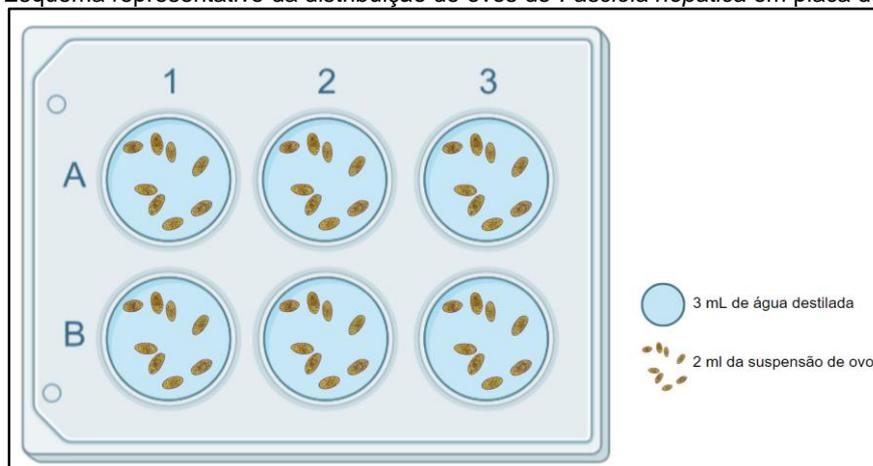
Sendo assim, considerando o impacto econômico e de saúde pública desta parasitose, atrelado a distribuição mundial e crescente no nosso país, se faz necessário a busca por mais pesquisas no assunto, em especial na caracterização e desenvolvimento de fases do ciclo de vida deste parasito. O presente estudo buscou explorar o estágio evolutivo de ovo, analisando e caracterizando sua fase embrionária.

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET-UFES). Os ovos de *Fasciola hepatica* foram coletados diretamente da vesícula biliar de bovinos positivos para fasciolose abatidos em um dos frigoríficos da região do sul do Espírito Santo em concordância com a Comissão de Ética no Uso de Animais - Campus Alegre (CEUA-Alegre-UFES) sob o protocolo 019/2023. O material foi sedimentado, sendo lavado por cerca de cinco vezes e permanecendo em decantação por 10 minutos em cada intervalo de descarte do sobrenadante.

Em seguida, os ovos foram diluídos em água destilada de forma que se obtivesse uma suspensão com a concentração de cerca de 200 ovos por mL e distribuídos em placas de cultivo celular de seis poços como demonstrado na Figura 1, de forma que se tivesse dois mL da suspensão de ovos e três mL de água destilada em cada poço, sendo logo em seguida cobertas um plástico Parafilm®. A placa foi levada a uma estufa de demanda de oxigênio do tipo B.O.D. a uma temperatura constante de 25°C durante 14 dias.

Figura 1 - Esquema representativo da distribuição de ovos de *Fasciola hepatica* em placa de seis poços



Fonte: Os autores.

A cada dia foram retirados cerca de dez ovos de cada poço sendo colocados entre lâmina e lamínula para que fosse realizada a observação e avaliação morfológica em microscópio óptico Olympus CX41 e realizadas as fotomicrografias, em microscópio óptico Nikon® em um aumento de 200x, da evolução do embrionamento dos ovos. Todos os resultados foram compilados em tabelas para posterior avaliação, quanto às características como comprimento e largura dos ovos, coloração, integridade da parede, presença de células germinativas e embriões em seu interior e quanto à formação miracidial.

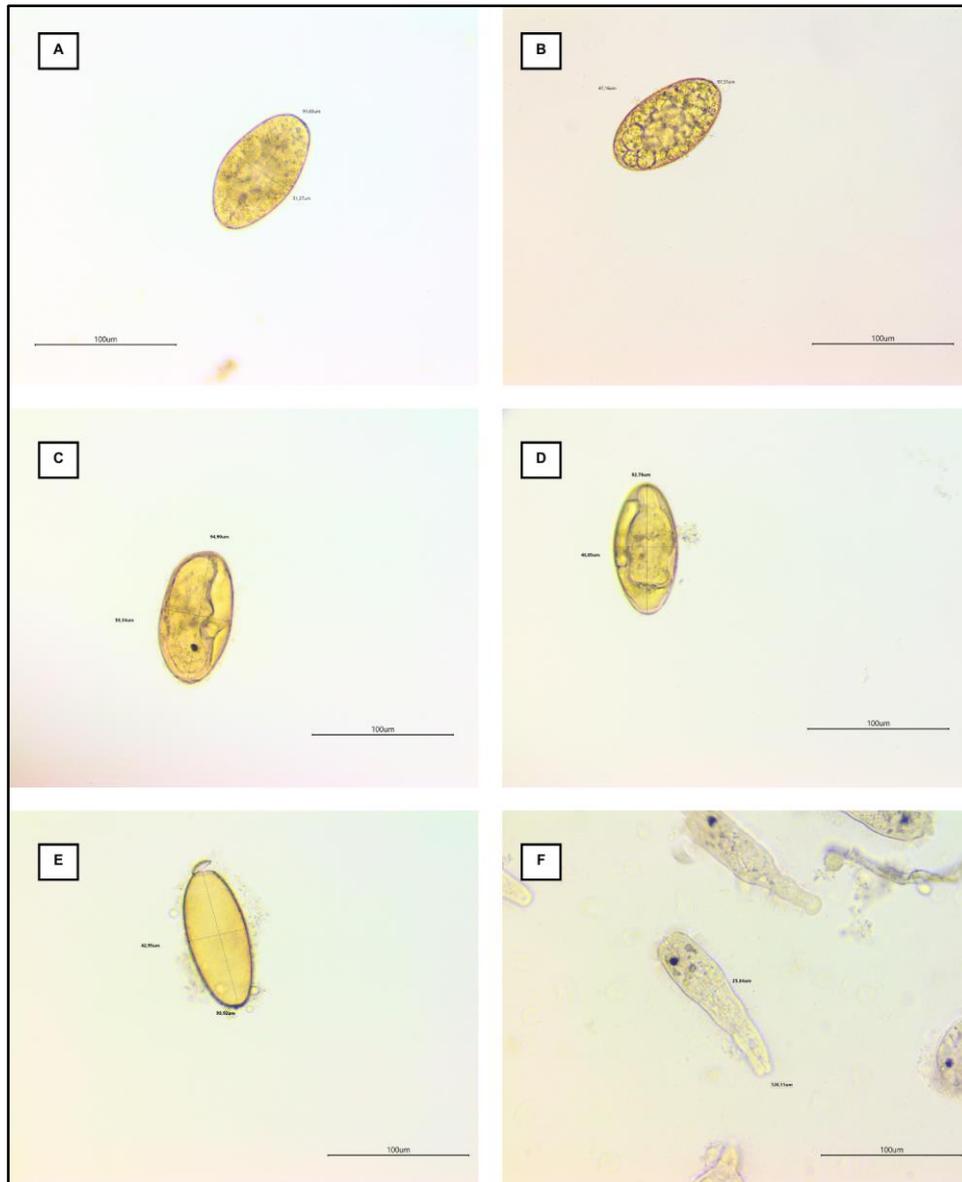
Resultados

Os ovos apresentaram uma medida média de 91,58 μm de comprimento e 62,48 μm de largura, sendo esta média mantida durante todo o desenvolvimento. Observou-se que até o terceiro dia do experimento não foi observado nenhuma alteração significativa nos ovos (Figura 2A). Os mesmos se apresentavam com coloração amarelada e formato elíptico, opérculo fechado, envoltos por uma cápsula proteica como uma casca fina, com as células vitelínicas em seu interior e na região central a formação embrionária em uma coloração um pouco mais clara.

Já no dia quatro do experimento (Figura 2B), foi possível observar que houve um aumento de células vitelínicas, assim como do embrião na região central que se apresentou como uma massa de células de maneira mais definida. No dia cinco foi possível observar uma massa densa e mais definida que posteriormente deu origem ao miracídio. O mesmo foi observado, com clareza, nos dias seis e sete (Figura 2C).

No décimo dia foi observada a presença da mancha ocular no miracídio (Figura 2 D). O desenvolvimento se manteve por igual até o décimo quarto dia, quando foi possível observar ovos com o opérculo aberto e miracídios livres, sendo que estes mediam em torno de 120 μm (Figuras 2 E e F). É importante destacar que as eclôsões miracidiais não ocorreram todas ao mesmo tempo, levando cerca de quatro horas para que todos os ovos da placa estivessem vazios. Além disso, os miracídios livres possuíam corpo afilado, a cutícula era ciliada com uma protusão de uma papila anterior e uma mancha escura na região anterior do corpo.

Figura 2 - Ovos de *Fasciola hepatica* em diferentes estágios de desenvolvimento. (A) Ovo no dia um. (B) Ovo no dia quatro. (C) Ovo no dia seis. (D) Ovo no dia 12. (E) Ovo vazio e operculado no dia 14. (F) Miracídio livre no dia 14.



Fonte: Os autores

Discussão

Na literatura pesquisada, não foi encontrado estudo que descreva cada fase do desenvolvimento do embrionamento de ovos de *Fasciola hepatica*, sendo portanto, este o primeiro registro sobre o tema. No estudo atual, as medidas médias dos ovos foram de 91,58 μm de comprimento e 62,48 μm de largura. Valero *et al.* (2001) avaliaram a morfometria de adultos e ovos de *Fasciola hepatica* e em sua pesquisa observaram que a média de comprimento dos ovos de bovinos foi de 105,29 μm e a largura foi de 61,67 μm . Além disso, os autores também observaram que os ovos possuem uma variação de tamanho conforme a espécie, como por exemplo, as medidas médias de ovos obtidos em ovelhas foram de 114,77 μm de comprimento por 65,5 μm de largura. Já nos ovos obtidos em suínos, o comprimento ficou em torno de 73,84 μm e a largura em 58,06 μm . Esse estudo sugere que os ovos de *F. hepatica* podem ter tamanhos diferentes de acordo com o hospedeiro definitivo.

Da mesma maneira, ao avaliar ovos de *F. hepatica* em renas, Loginova *et al.* (2024), constataram que a média de tamanho dos ovos foi cerca de 71,2 x 128,9 μm . Além disso, no mesmo estudo, nas imagens micrográficas foi possível observar um apêndice na porção do ovo oposta ao opérculo. Essa estrutura não foi observada nos ovos na presente pesquisa.

Valero *et al.* (2009) realizaram um estudo em que observaram as características morfométricas de ovos de *F. hepatica* que foram encontrados em exames coproparasitológicos de diferentes hospedeiros. Nas amostras de fezes de humanos, a extremidade abopercular da casca do ovo era frequentemente irregular, sendo que esta alteração foi mais comum na Bolívia e na Geórgia e menos comum no Egito, e ainda, não sendo encontrada em ovos vistos em amostras de fezes bovinas. Os autores afirmam que a alteração é dependente da população, e portanto, as características aqui descritas podem ser divergentes de outras descritas em regiões diferentes.

Assim como no estudo realizado por Hussein *et al.* (2010) com parasitos de bovinos, os ovos aqui também se apresentaram grandes, amarelados, com formato ovalado e com opérculo fino. No mesmo estudo, os autores constataram que o miracídio após a emergência mediu entre 220 e 500 μm , já no atual estudo, os miracídios apresentaram medidas próximas a 120 μm .

Fairweather *et al.* (2012), em seu estudo classificaram os ovos em grupos distintos de acordo com os estágios de desenvolvimento. Para os autores, os ovos não desenvolvidos consistem em uma massa de células que compreende oócitos e células vitelínicas que ainda não se desenvolveram. Ovos semelhantes a esses foram observados nos quatro primeiros dias do experimento. Ainda, os autores afirmam que o estágio de divisão celular é atingido próximo aos sete dias de incubação, sendo observado as células embrionárias se dividindo e crescendo, enquanto as células vitelínicas diminuem. Entretanto no estudo, esse estágio de desenvolvimento foi observado a partir do quinto dia. O estágio de mancha ocular é alcançado após os 11 dias de desenvolvimento, segundo os autores, demonstrando que o miracídio se encontra quase totalmente formado, sendo que no presente estudo isso aconteceu aos dez dias, talvez em função da forma de incubação, pois fatores como temperatura, umidade e até luminosidade podem influenciar, conforme relatado por Andrews *et al.* (2021). A mancha ocular é visível como um ponto preto na parte posterior do miracídio. Além disso, para os pesquisadores, sacos germinativos também podem ser observados posteriormente, juntamente com uma almofada viscosa que também se forma logo após o opérculo. Este é classificado como o estágio final de desenvolvimento.

Quanto à eclosão miracidial, é importante destacar que a eclosão miracidial não ocorreu de maneira conjunta. Alemu (2019) afirma que isso é um mecanismo de sobrevivência do parasito. Além disso, o mesmo autor afirma que os miracídios possuem uma cutícula ciliada com a protrusão de uma papila anterior e manchas escuras visíveis na parte anterior do corpo, exatamente como foi observado no atual trabalho.

Como relatado por diversos autores, um fator importante para o desenvolvimento dos ovos é a temperatura. No presente estudo, os ovos foram mantidos a uma temperatura constante de 25°C ao longo dos 14 dias. Para Ilgová *et al.* (2022), esta é considerada uma temperatura ideal para o desenvolvimento dos ovos. Em seus estudos, os autores observaram que os ovos que foram mantidos a 37°C tiveram o seu desenvolvimento retardado, além de terem a taxa de mortalidade dos miracídios aumentada.

Conclusão

O presente estudo conseguiu demonstrar a morfologia de ovos de *Fasciola hepatica* durante o seu desenvolvimento embrionário, concluindo que a partir de 14 dias é possível encontrar miracídios proporcionando uma contribuição significativa no conhecimento sobre o ciclo do parasito. Além disso, a comparação da morfometria de ovos entre diferentes hospedeiros pode ter implicações para a compreensão da biologia do parasito e do impacto da fasciolose em diferentes espécies.

Referências

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

ANDREWS, S. J.; CWIKLINSKI, K.; DALTON, J. P. The Discovery of *Fasciola hepatica* and its Life Cycle. In: DALTON, J.P. **Fasciolosis**. 2. Ed. Wallingford UK: CABI, 2021. Cap 1, p. 1-22. DOI: <https://doi.org/10.1079/9781789246162.0001>

CHARLIER, J. *et al.* Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. **Parasitology**, v. 141, n. 3, p. 326-335, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182013001662>

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. 3-4, p. 249-259, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.023>

MARTINS *et al.* Application of geograohical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3, p. 87-93, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4081/gh.2012.126>

HUSSEIN, A. N. A.; HASSAN, I. M.; KHALIFA, R. M. A. Development and hatching mechanism of *Fasciola* eggs, light and scanning electron microscopic studies. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 3, p. 247-251, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.04.010>

ILGOVÁ, J. *et al.* Transcriptomic and proteomic profiling of peptidase expression in *Fasciola hepatica* eggs developing at host's body temperature. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 10308, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14419-z>

LOGINOVA, O. *et al.* *Fasciola hepatica*: Updates on egg morphology, host range, and distribution. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 36, p. e00237, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2024.e00237>

MARTINS, I. V. F.; SPERANDIO, N. C. Fasciolosis in ruminants in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 46, p. e002924, 2024. DOI: <https://doi.org/10.29374%2F2527-2179.bjvm002924>

OLIVEIRA, D. M.; RESENDE, P. O. *Fasciola hepatica*: ecologia e trajetória histórico-geográfica pelo Brasil. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 2, 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n2.p09-19

SPERANDIO, N.C. **ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE *Pseudosuccinea columella* (BASOMATOPHORA: LYMNAEIDAE) FRENTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)**. 2022 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2022.

VALERO, M. A. *et al.* Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. **Acta tropica**, v. 111, n. 2, p. 150-159, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.04.005>

VALERO, M. A. *et al.* Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 85-100, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00499-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00499-X).

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).