

## **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA A ALBENDAZOLE DE ISOLADOS DE *Fasciola hepatica* OBTIDOS DE RUMINANTES DO ESTADO DE SANTA CATARINA<sup>1</sup>**

Ana Luiza Bilck Girardi<sup>2</sup>, Andreas Lazaros Chryssafidis<sup>3</sup>, Larissa Américo<sup>4</sup>, Heloisa Ottequir<sup>5</sup>, Larissa Godeski Moreira<sup>5</sup>, Maria Eduarda Albano<sup>5</sup>, Marieli Ayumi Kaibara<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Vinculado ao projeto “Avaliação *in vitro* de resistência a anti-helmínticos de isolados de *Fasciola hepatica* obtidos de ruminantes do Estado de Santa Catarina”

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Bolsista PIBIC/CNPq

<sup>3</sup> Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br

<sup>4</sup> Mestranda do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC

<sup>5</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

A fasciolose é causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica*, um parasito encontrado em ruminantes de algumas regiões do Brasil. Além de ser considerada uma zoonose negligenciada, também gera grande prejuízo aos produtores rurais. A resistência anti-helmíntica é um problema crescente no controle da fasciolose. Na região Sul do Brasil, diversas características geoambientais são favoráveis ao desenvolvimento dos caramujos limneídeos, que atuam como hospedeiros intermediários de *F. hepatica*. Uma das drogas mais empregadas para o tratamento de *F. hepatica* pelos produtores da região é o albendazole. Recentemente, foi demonstrada a correlação entre a resistência detectada em ovos tratados *in vitro* com a resistência dos vermes adultos tratados *in vivo*. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi comparar dois protocolos para avaliação *in vitro* da resistência de *F. hepatica* ao albendazole, utilizando um protocolo desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) e outro descrito em literatura. Para isso, foi utilizado um pool de ovos coletados das vesículas biliares de quatro bovinos abatidos na região do Planalto Serrano, com origem nos municípios de Lages, Paineal e Chapecó. Os animais foram verificados na linha de inspeção do Frigorífico Fox, em Lages, Santa Catarina e, após detecção da *F. hepatica* adulta nos ductos biliares, a vesícula biliar era coletada e transportada ao LAPAR para processamento. A bile foi coletada e diluída em frascos de sedimentação, na proporção de 1:10, sedimentando por 10 min, e em seguida o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se o procedimento e os sedimentos foram transferidos para tubos de centrifugação de 50 ml, sendo centrifugados por 10 min a 1.500 rpm, descartando-se o sobrenadante. Com uma pipeta de Pasteur, os sedimentos de todos os tubos foram unificados em um único tubo de centrifugação de 50 ml. A amostra foi novamente centrifugada por 4 min a 1500 rpm, sendo o volume total reduzido para 20 ml. A quantificação aproximada de ovos/ml foi realizada através da contagem do total de ovos presentes em três alíquotas de 100 µl diluídas em 1:10, sendo calculada a média aritmética. Da vesícula biliar dos quatro animais, foi recuperado um total de 112 mil ovos de *F. hepatica*. Foram formados oito grupos experimentais, com seis repetições por grupo, utilizando aproximadamente 1000 ovos por repetição e volume total final de 40 ml. Os tratamentos foram: G1 (dose terapêutica correspondente de Endazol 10%), G2 (dose terapêutica correspondente de Meltra 18,75%), G3 (dose terapêutica correspondente de RICOFarm 10 %), G5 (0,5 µmol/ml de Endazol 10%), G6 (0,5 µmol/ml de Meltra 18,75%), e G7 (0,5 µmol/ml de RICOFarm 10 %). Os grupos G4 e G8 eram os controles, tratados somente com água destilada. Nos grupos G1 a G4, a solução de tratamento foi preparada, adicionada aos ovos e

os frascos colocados diretamente na estufa a 27 °C por 28 dias. Em G5, G6 e G7, os ovos foram colocados em 20 ml de solução com 0,5 µmol/ml de albendazole, concentração descrita em literatura como a melhor para detecção de resistência, sendo incubadas por 12 horas na estufa a 27 °C. Após incubação, foram adicionados 20 ml de água destilada, e as amostras centrifugadas a 1.500 rpm por 4 min, descartando-se o sobrenadante e repetindo a operação duas vezes para lavagem. Então, foi adicionado água destilada até o volume de 40 ml e as amostras foram transferidas para estufa a 27 °C, sendo incubadas por 28 dias. Ao final da incubação, os ovos foram examinados sob estereomicroscópio, sendo anotado o estágio de evolução, como não desenvolvidos (conteúdo indissociado) e desenvolvidos (embrionados, com miracídio móvel, ou eclodidos). Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 1. Como conclusão do estudo, não houve detecção de resistência ao albendazole nos animais amostrados, e ambos os protocolos apresentaram resultados muito semelhantes, portanto, o protocolo simplificado desenvolvido no LAPAR pode ser utilizado na avaliação *in vitro* da resistência de *F. hepatica* a antiparasitários. Esta análise será aplicada em amostras provenientes de diferentes regiões de Santa Catarina, possibilitando o mapeamento da resistência do parasito no Estado.

**Tabela 1.** Desenvolvimento dos ovos de *Fasciola hepatica* coletados de vesícula biliar de bovinos, incubados por 28 dias na estufa a 27 °C, sob diferentes tratamentos

| GRUPO | FÁRMACO                    | TOTAL DE OVOS EXAMINADOS | OVOS NÃO DESENVOLVIDOS<br>n (%) | OVOS EMBRIONADOS OU ECLODIDOS<br>n (%) |
|-------|----------------------------|--------------------------|---------------------------------|--|
| G1    | Endazol 10% 4µl / 40ml     | 600                      | 596 (99,3)                      | 4 (0,7)                                |
| G2    | Meltra 18,75% 1,2µl / 40ml | 600                      | 600 (100,0)                     | 0                                      |
| G3    | RICOFarm 10% 2µl / 40ml    | 600                      | 600 (100,0)                     | 0                                      |
| G4    | Controle                   | 600                      | 38 (6,3)                        | 562 (93,7)                             |
| G5    | Endazol 10% 0,5 µmol/ml    | 542                      | 541 (99,8)                      | 1 (0,2)                                |
| G6    | Meltra 18,75% 0,5 µmol/ml  | 600                      | 597 (99,5)                      | 3 (0,5)                                |
| G7    | RICOFarm 10% 0,5 µmol/ml   | 600                      | 600 (100,0)                     | 0                                      |
| G8    | Controle                   | 592                      | 0                               | 592 (100,0)                            |

**Palavras-chave:** Fasciolose. Resistência anti-helmíntica. Controle parasitário.