

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*)

EVELINE ALBUQUERQUE MENDES

Belo Horizonte

2006

EVELINE ALBUQUERQUE MENDES

Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Walter dos Santos Lima

BELO HORIZONTE
2006

É preciso viver o sonho e a certeza de que tudo vai mudar.

É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os desejos não precisam de razão, nem os sentimentos, de motivos.

O importante é viver cada momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver...

Realize seus sonhos;

Viva o momento em que eles acontecerem e, nesses momentos, descubra novos sonhos.

Anônimo

Para o Daniel, Camila e Roberto

Agradecimentos

- Aos meus filhos, Daniel e Camila, que acreditaram no meu sonho;
- Ao Roberto, por seu amor e cumplicidade;
- À minha mãe, que muito me ajudou;
- Ao meu professor e orientador, Walter dos Santos Lima, pela confiança e apoio;
- Ao Professor Anilton C. Vasconcelos, do Departamento de Patologia Geral, ICB-UFMG, Laboratório de Apoptose, que gentilmente auxiliou na interpretação dos resultados;
- Ao Professor Alan Lane de Melo, por sua ajuda;
- Ao Professor Múcio F. Ribeiro, que cordialmente registrou as primeiras alterações macroscópicas;
- Ao Professor Marcus Pezzi Guimarães, pelas correções;
- À Professora Teofânia e alunos do Laboratório de Malacologia, que filmaram cercárias e rédias;
- À professora Luciana, do Departamento de Patologia Geral, ICB-UFMG, Laboratório de Apoptose, por sua alegria de viver;
- A Lanuze, uma pessoa singular; forte; determinada...; sua amizade tornou tudo muito mais fácil, obrigado por tudo, por sua ajuda incondicional, indispensável durante esta trajetória; minha amiga que quero guardar para sempre;
- Ao Eduardo e ao Márcio, pelo conhecimento partilhado; amigos que também quero guardar para sempre;
- Aos colegas do Laboratório de Culicídeos, especialmente ao Andrey e Givago, sempre prontos a me ajudar, me auxiliaram principalmente no registro das alterações macroscópicas;
- Ao Michel do Laboratório de Ectoparasitos, que gentilmente registrou as principais alterações microscópicas;
- Ao Daniel do Laboratório de Ectoparasitos, por sua ajuda e amizade;
- A Heloisa, pelo exemplo de perseverança;

- A Karina, pela amizade, ajuda e sinceridade;
- Ao Thiago, pela disposição em ajudar;
- A Rosálida, por sua habilidade com as mãos e, principalmente com as palavras;
- Aos amigos Edna Maia, Maria da Conceição, Hudson, Leonardo, Érika, Mercedes, Márcia, Lívio, Késia, Jefferson e Joãozinho, pela boa vontade em ajudar;
- Aos meus colegas de laboratório Silvia, Viviane e Leo, Josiane e Thales, pelo respeito;
- Aos meus colegas da Pós-Graduação, pelo convívio, amizade e carinho;
- A Soraia, pela confecção das lâminas;
- Ao José Carlos, pelas coletas diárias e carinho com os animais;
- Aos amigos, Carlos, Márcia e Adão, pelo carinho e amizade;
- Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, que sempre me atenderam com um sorriso;
- Em especial a Sumara pelo exemplo de pessoa humana;
- Às “meninas” da Biblioteca do ICB, em especial a Ana Paula, um exemplo de profissional e uma pessoa maravilhosa.
- Ao Ivair Ramos Silva do Laboratório de Estatística Espacial, Departamento de Estatística, ICEX-UFMG, pelo auxílio nas análises estatísticas;
- A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

Metacercárias de *Fasciola hepatica* foram utilizadas na infecção de *Callithrix penicillata* e *Meriones unguiculatus*. Os *C. penicillata* foram infectados via oral com dez metacercárias. Foi verificada uma média diária de 1.089 a 4.356 ovos, sugerindo que estes constituem modelos animais adequados à manutenção do ciclo biológico de *F. hepatica* em laboratório. Os *M. unguiculatus* foram infectados via oral com cinco metacercárias. O período pré-patente foi em média de $55,57 \pm 2,34$ dias. O baixo número de ovos nas fezes sugere que estes animais não constituem modelos de laboratório adequados à manutenção do ciclo do parasito. Miracídios foram utilizados na infecção de *L. columella* e a produção dos estádios evolutivos do parasito, determinada. O número médio de rédias e metacercárias oriundas de *F. hepatica* de bovinos foi superior às obtidas de *F. hepatica* dos *C. penicillata*. A análise morfométrica dos ovos mostrou a ocorrência de diferenças morfológicas. Foi realizada a infecção experimental de *M. unguiculatus* com diferentes cargas parasitárias e avaliadas alterações patológicas macroscópicas e microscópicas e o perfil hematológico do sangue periférico através do hematócrito e contagens global e diferencial de leucócitos. As lesões se concentraram principalmente no fígado. O perfil hematológico do sangue periférico indicou uma resposta celular inespecífica.

Abstract

Metacercariae of *Fasciola hepatica* deriving from bovines were used in the experimental infection of *Callithrix penicillata* and *Meriones unguiculatus*. The elimination of parasitic eggs in the excrements of both hosts was evaluated. In the infection of *C. penicillata* significantly high averages of OPG were verified, suggesting that these animal models are suitable to the maintenance of the biological cycle of *F. hepatica* in laboratory. The reduced number of eggs of *F. hepatica* eliminated in the excrements of *M. unguiculatus* suggests that these animals are not suitable laboratory models to the maintenance of the biological cycle of the parasite. Miracidia were used in the infection of *L. columella* and the production of the evolutionary stadiums of the parasite, determined. The average number of rediae and metacercariae of *F. hepatica* deriving from bovines was higher to the number deriving from *C. penicillata*. The morfometric analyses of eggs from the parasite showed the occurrence of morphological differences. The experimental infection of *M. unguiculatus* was done with different parasitic loads, the macroscopic and microscopic pathological alterations and the hematological pattern of the peripheral blood, through hematócrito and global and differential counting of leukocytes, were evaluated. The injuries concentrate mainly in the liver. The hematological pattern of the peripheral blood indicated an unspecific cellular response.

Listas

Figuras

- FIGURA 1- Valores médios das contagens de ovos por grama de fezes de *Fasciola hepatica* oriunda de *Callithrix penicillata*..... 58
- FIGURA 2- Proporção dos valores médios observados e estimados de probabilidade de ocorrência de ovos de *Fasciola hepatica* oriunda de *Meriones unguiculatus* 62
- FIGURA 3- Valores medianos do número de metacercárias e rédias de *Fasciola hepatica* oriunda de bovinos (B) e de *Callithrix penicillata* (A), durante todo o período de estudo. 67
- FIGURA 4- Valores médios do número de rédias e metacercárias de *Fasciola hepatica* oriunda de bovinos (----) e de *Callithrix penicillata* (—), ao longo do período de estudo. 68
- FIGURA 5- Fígado de um gerbil infectado com oito metacercárias, aos 20 DPI, com dilatação da vasícula biliar. 75
- FIGURA 6- Rim direito de um gerbil infectado com cinco metacercárias, aos 40 DPI, apresentando aumento de volume, superfície irregular, áreas de hemorragia e focos de necrose (setas).....75
- FIGURA 7A- Fotomicrografia do fígado de um gerbil infectado com 3Mc, aos 20 DPI, mostrando extensa área de hemorragia (asterisco) e discreto infiltrado inflamatório com polimorfonucleares ao redor (seta).....79
- FIGURA 7B- Fotomicrografia do detalhe anterior mostrando alterações no espaço porta; dilatação do ducto biliar (seta em flecha), dilatação em ramo da artéria hepática (asterisco) e rompimento da veia porta com hemorragia (seta de duas cabeças).....79

FIGURA 8A- Fotomicrografia do fígado de um gerbil infectado com 3Mc, aos 80 DPI, mostrando área de hemorragia antiga de coloração castanho-escuro, com deposição de hemossiderina (seta de duas cabeças).....	80
FIGURA 8B- Fotomicrografia do detalhe anterior mostrando infiltrado inflamatório (seta) ao redor da área de hemorragia antiga.....	80
FIGURA 9A- Fotomicrografia do fígado de um gerbil infectado com 5Mc, aos 30 DPI, mostrando extensa área de hemorragia (asterisco) e área de deposição de proteínas do parasito (seta de pontas redondas).....	81
FIGURA 9B- Fotomicrografia do detalhe anterior mostrando infiltrado inflamatório ao redor, formado por polimorfonucleares e predomínio de mononucleares (setas) ao redor das áreas de hemorragia (asteriscos) e deposição de proteínas (seta de pontas redondas).....	81
FIGURA 10A- Fotomicrografia do baço de um gerbil infectado com 3Mc, aos 20 DPI, mostrando o rompimento de um folículo (seta); áreas de hemorragia (asteriscos) e de necrose (seta larga).....	82
FIGURA 10B- Fotomicrografia mostrando extensa área de hemorragia (asterisco) e deposição de fibrina ao redor (seta larga de uma cabeça).....	82
FIGURA 11A- Fotomicrografia do rim direito do gerbil infectado com 5Mc, aos 40DPI, mostrando quatro ovos de <i>Fasciola hepatica</i> com infiltrado inflamatório constituído predominantemente por polimorfonucleares (setas) e áreas de hemorragia no parênquima (asteriscos).....	83
FIGURA 11B- Fotomicrografia do rim direito mostrando intenso infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares, no parênquima do órgão e ao redor de dois ovos de <i>Fasciola hepatica</i> (setas).....	83

FIGURA 11C- Fotomicrografia do rim direito do gerbil infectado com 5Mc, aos 40 DPI, mostrando um ovo de <i>Fasciola hepatica</i> com infiltrado inflamatório ao redor formado por polimorfonucleares e áreas de hemorragia no parênquima do órgão.....	84
FIGURA 12- Fotomicrografia do diafragma de um gerbil infectado com 3Mc, aos 80 DPI, mostrando ovos de <i>Fasciola hepatica</i> aderidos ao tecido conjuntivo e escassos macrófagos formando discreta reação fibrótica (seta).....	84
FIGURA 13A- Fotomicrografia dos linfonodos mesentéricos de um gerbil infectado com 3Mc, aos 80 DPI, mostrando vários ovos de <i>Fasciola hepatica</i> aderidos ao tecido.....	85
FIGURA 13B- Fotomicrografia do detalhe anterior mostrando um ovo de <i>Fasciola hepatica</i>	85
FIGURA 14- Valores médios do hematócrito dos <i>Meriones unguiculatus</i> grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de <i>Fasciola hepatica</i> de bovinos.	88
FIGURA 16- Valores médios do número de leucócitos dos <i>Meriones unguiculatus</i> grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de <i>Fasciola hepatica</i> de bovinos.	94
FIGURA 17- Valores médios do número de neutrófilos bastonetes dos <i>Meriones unguiculatus</i> grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de <i>Fasciola hepatica</i> de bovinos.....	95

FIGURA 18- Valores médios do número de neutrófilos segmentados dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.....96

FIGURA 19- Valores médios do número de basófilos dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.97

FIGURA 20- Valores médios do número de linfócitos dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.....98

FIGURA 21- Valores médios do número de monócitos dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.....99

Tabelas

TABELA 1 - Valores médios das contagens do OPG dos <i>Meriones unguiculatus</i> positivos, realizadas em intervalos de 30 dias até 226 dias após o período pré-patente.....	61
TABELA 2 – Medidas de comprimento e largura de ovos de <i>Fasciola hepatica</i> oriunda de bovinos, de <i>Callithrix penicillata</i> e <i>Meriones unguiculatus</i>	64
TABELA 3- Percentagem dos <i>Meriones unguiculatus</i> dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc, infectados experimentalmente com três, cinco e oito metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> oriunda de bovinos, respectivamente, após a passagem em <i>Callithrix penicillata</i> , que apresentaram lesões no período do 10° ao 100° DPI com intervalos de dez dias, quando foram realizadas necropsias.....	72
TABELA 4- Órgãos que apresentaram alterações macroscópicas encontradas nos <i>Meriones unguiculatus</i> dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc, infectados experimentalmente com três, cinco e oito metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> oriunda de bovinos, respectivamente, após a passagem em <i>Callithrix penicillata</i> , no período do 10° ao 100° DPI com intervalos de dez dias quando foram realizadas necropsias.....	73
TABELA 5- Número de parasitos e ovos de <i>Fasciola hepatica</i> recuperados dos <i>Meriones unguiculatus</i> infectados experimentalmente com três, cinco e oito metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> oriunda de bovinos, respectivamente, após a passagem em <i>C. penicillata</i> , no período do 10° ao 100° DPI com intervalos de dez dias quando foram realizadas necropsias.....	74

Abreviaturas

Mc – Metacercárias

GI – Gerbil infectado

GNI – Gerbil não infectado

OPG – Ovos por grama de fezes

G3Mc - Gerbil infectado com três metacercárias

G5Mc - Gerbil infectado com cinco metacercárias

G8Mc - Gerbil infectado com oito metacercárias

GSI - Gerbil sem infecção

G1 a G7 - Gerbil número um..., Gerbil número sete

DPI - Dias após a infecção

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão de Literatura	17
2.1. Histórico.....	18
2.1.1. Hospedeiro intermediário	20
2.2. Biologia.....	22
2.3. Patogenia.....	24
2.4. Epidemiologia	25
2.5. Diagnóstico	30
2.5.1. Diagnóstico parasitológico	30
2.5.2. Diagnóstico hematológico	32
2.6. <i>Fasciola hepatica</i> em hospedeiro primata não humano	32
2.7. <i>Fasciola hepatica</i> em gerbil	33
3. Justificativa	35
4. Objetivos	37
4.1. Objetivo geral	38
4.2. Objetivos específicos	38
5. Material e métodos	40
5.1. Manutenção do ciclo de <i>F. hepatica</i> em laboratório	41
5.2. Animais	42
5.2.1. Infecção de <i>Callithrix penicillata</i>	42
5.2.2. Infecção de <i>Meriones unguiculatus</i>	43
5.3. Coleta de fezes e exame coprológico para obtenção de ovos.....	44
5.4. Obtenção dos estádios evolutivos	46
5.4.1 Miracídeos	46
1. Infecção de moluscos	47
5.4.2. Cercárias	48
5.4.3. Metacercárias	49

5.5. Estádios evolutivos de <i>F. hepatica</i> na infecção experimental de <i>L. columella</i>	50
5.6. Variabilidade morfológica de ovos de <i>F. hepatica</i>	50
5.7. Alterações patológicas	50
5.7.1. Alterações macroscópicas e microscópicas	51
5.7.2. Perfil hematológico.....	52
6. Análise estatística.....	53
7. Resultados	55
7.1. Dinâmica da eliminação de ovos de <i>F. hepatica</i> na infecção de <i>C. penicillata</i>	56
7.2. Dinâmica da eliminação de ovos de <i>F. hepatica</i> na infecção de <i>M. unguiculatus</i>	59
7.3. Variabilidade morfológica dos ovos de <i>F. hepatica</i>	63
7.4. Produção de rédias e metacercárias de <i>F. hepatica</i>	65
7.5. Alterações patológicas macroscópicas observadas em <i>M. unguiculatus</i> infectados por diferentes números de metacercárias de <i>F. hepatica</i>	69
7.5.1. Recuperação de parasitos	70
7.6. Alterações patológicas microscópicas observadas em <i>M. unguiculatus</i> infectados por diferentes números de metacercárias de <i>F. hepatica</i>	76
7.7. Perfil hematológico na infecção de <i>M. unguiculatus</i> infectados por diferentes números de metacercárias de <i>F. hepatica</i>	86
7.7.1 Hematócrito	86
7.7.2. Contagem global de leucócitos	89
7.7.3. Contagem diferencial	90
7.7.3.1. Neutrófilos bastonetes	90
7.7.3.2. Neutrófilos segmentados.....	90
7.7.3.3. Basófilos	91
7.7.3.4. Linfócitos	92
7.7.3.5. Monócitos	93

8. Discussão	100
8.1. Dinâmica da eliminação de ovos de <i>F. hepatica</i> na infecção de <i>C. penicillata</i>	101
8.2. Dinâmica da eliminação de ovos de <i>F. hepatica</i> na infecção de <i>M. unguiculatus</i>	102
8.3. Variabilidade morfológica dos ovos de <i>F. hepatica</i>	103
8.4. Produção de rédias e metacercárias de <i>F. hepatica</i>	104
8.5. Alterações patológicas macroscópicas e microscópicas.....	105
8.6. Perfil hematológico na infecção de <i>M. unguiculatus</i> infectados por diferentes números de metacercárias de <i>F. hepatica</i>	109
9. Conclusões	114
10. Referências	117

1. Introdução

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) parasito da Classe Trematoda, Subclasse Digenea e Família Fasciolidae é um dos helmintos parasitos de animais domésticos e silvestres mais importantes, devido à alta morbidade e mortalidade, sendo responsável pela doença conhecida como fasciolose. Sua importância, em áreas de criação de bovinos e ovinos, está principalmente associada às perdas com condenações de fígados, mortalidade, redução na produção de carne, leite e lã, às infecções bacterianas secundárias, à interferência com a fertilidade e aos custos com tratamentos anti-helmínticos (Echevarria *et al.*, 1992). Além disso, a fasciolose é uma zoonose e apresenta também importante papel na saúde pública.

A ocorrência de *F. hepatica* está relacionada a fatores como, presença do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Lymnaea*; disponibilidade de habitats adequados para a sobrevivência dos moluscos e condições de temperatura e umidade favoráveis. Além desses, a presença do hospedeiro definitivo eliminando ovos e contaminando as pastagens constituem mais um dos importantes aspectos envolvidos na epidemiologia e controle da fasciolose (Boray, 1969; Costa *et al.*, 1987).

Estudos sobre a presença de *F. hepatica* parasitando diferentes espécies de hospedeiros indicam a participação destes animais como seus hospedeiros definitivos e permitem a escolha de um modelo experimental adequado para manutenção do ciclo biológico do parasito em laboratório. Diversos autores têm demonstrado tanto em infecções naturais quanto experimentais a

suscetibilidade de outros hospedeiros relatando a aquisição da infecção de roedores das espécies *Rattus rattus*, *Tscherskia triton*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus*; de marsupiais *Vombatus hirsutus* e primatas da espécie *Callithrix penicillata* e gênero *Macaca* (Tomimura *et al.*, 1975; Espino *et al.*, 1997; Valero *et al.*, 1998; Coelho, 2001; Terasaki *et al.*, 2003).

Boray (1969), ao mencionar a ocorrência de diferentes hospedeiros, além de bovinos e ovinos suscetíveis à infecção por *F. hepatica*, destacou a importância do estudo de pequenos animais domésticos e silvestres com o propósito do entendimento dos diferentes papéis destes na patogenia e epidemiologia da fasciolose, podendo contribuir para o entendimento, da transmissão e disseminação da doença entre as diferentes espécies de animais domésticos e silvestres.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

O primeiro registro de *F. hepatica* data do século IX, quando no Tratado de Saúde Animal do Mundo Árabe no ano de 865AC, cita a ocorrência de uma “doença do fígado” em ovinos (Rezende, 1979). Lesões encontradas no fígado de animais foram somente relacionadas à presença de *F. hepatica* em 1739 por Jehan de Brie (1379) in Taylor (1965). Foi o primeiro trematódeo a ter o ciclo biológico descrito, a partir dos estudos de Leuckart (1882) na Alemanha, que também citou a participação de *Lymnaea truncatula* como seu hospedeiro intermediário.

No Brasil, o primeiro relato sobre *F. hepatica* foi feito por Lutz (1921), através de um achado ocasional em fígados de bovinos no município de Três Rios Estado do Rio de Janeiro. A partir desta data, diversas observações foram realizadas, baseadas principalmente em dados sobre a ocorrência e ou prevalência da fasciolose em bovinos em frigoríficos.

Carvalho (1940) mencionou a ocorrência de *F. hepatica* em um bovino de procedência ignorada enviado ao município de Viçosa pela Secretaria da Agricultura do Estado de Minas Gerais.

A ocorrência e ou prevalência de *F. hepatica* foi relatada em varias regiões do Brasil, principalmente por meio de observações realizadas em matadouros e frigoríficos. Ribeiro (1949) avaliou a condenação de carcaças e vísceras de bovinos em matadouros do Brasil Central (área que compreendia

os Estados de São Paulo, Mato Grosso, Goiás e zona do Triângulo Mineiro) e relatou uma incidência de 2,93% e 3,40% para os anos de 1946 e 1947, respectivamente.

No Estado do Rio Grande do Sul, entre 1958 e 1963, Corrêa (1965) avaliou em 7,99% o índice de infecção de bovinos abatidos em matadouro.

Dados igualmente significativos foram registrados por França (1969) para o Vale do Paraíba, no Estado de São Paulo que relatou o encontro do parasito em 10,1% dos 941 bovinos inspecionados no matadouro municipal de Taubaté.

Segundo Honer (1979), a maior área enzoótica está situada ao sul do país, com uma extensão de grande importância na região centro-sul, o Vale Paraíba.

Ueno *et al.* (1982), avaliando a importância econômica da fasciolose na exploração pecuária em Santa Vitória do Palmar no Estado do Rio Grande do Sul, registraram que os índices médios anuais de condenações de fígados durante o ano de 1979 corresponderam entre 12-13% em bovinos e 7% em ovinos, revelando o encontro de várias áreas endêmicas próximas às regiões de fronteira do sul do Estado,. Estes autores também observaram a presença de duas espécies de limineídeos, *L. viatrix* e *L. columella*, distribuídas pelas regiões do Estado atuando como hospedeiros intermediários de *F. hepatica*.

Amato *et al.* (1986), no Estado do Rio de Janeiro, demonstrou através de estudos epidemiológicos em animais traçadores a incidência da fasciolose.

Beck (1993), ao relatar dados sobre a prevalência de *F. hepatica* no rebanho bovino nacional investigado através da inspeção em matadouros ou

em exames de fezes assinalou a ocorrência do parasito nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais.

Caldas *et al.* (1995) ao pesquisarem em amostras de fezes de bovinos oriundos de 51 municípios em seis mesoregiões do Estado de Minas Gerais observaram maior índice de prevalência, 9,05%, no o município de Itajubá, sul do Estado.

Dados estatísticos fornecidos pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura no Brasil demonstram que a ocorrência de *F. hepatica* e a condenação de fígados pela fasciolose vêm aumentando gradativamente. As áreas mais atingidas estão localizadas no Rio Grande do Sul (principalmente em áreas de fronteira), Santa Catarina (Vale do Itajaí), São Paulo (Vale do Paraíba), Rio de Janeiro, região Sul de Minas Gerais e mais recentemente nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná no Estado do Paraná (Queiroz *et al.*, 2002).

2.1.1. Hospedeiro intermediário

A participação de moluscos aquáticos do gênero *Lymnaea* no ciclo biológico de *F. hepatica* foi mencionada pela primeira vez no Brasil por Lutz (1921) ao relatar a presença no Estado do Rio de Janeiro de moluscos da espécie *Lymnaea ochrostigma* infectado com rédias e cercárias.

Estes moluscos encontram-se amplamente distribuídos nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás, São Paulo, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Paraense, 1982). A primeira referência sobre o encontro de limneídeos na região nordeste do Brasil ocorreu após a descrição feita por Paraense (1986) de uma população de *L. columella* presente no Dique do Tororó, um lago urbano da cidade de Salvador, Estado da Bahia. Nesse trabalho, o autor também relatou a presença do molusco em Tefé, no Estado do Amazonas região norte do país. Entre os anos de 1995 e 1996 um estudo malacológico realizado por Abílio *et al.* (1998), registrou a ocorrência de *L. columella* na região nordeste do país, Estado da Paraíba.

Ueta (1980) observou a ocorrência de infecção natural de *L. columella* por *F. hepatica* no Vale do Paraíba em São Paulo.

No ano de 1995, Silva *et al.*, fizeram o primeiro relato sobre a ocorrência do molusco *L. columella*, hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, encontrado naturalmente infectado por estádios larvares do parasito em regiões de várzea no município de Itajubá em Minas Gerais.

Coelho & Lima (2003) entre os meses de Setembro de 1999 a Dezembro de 2000, ao estudarem a dinâmica e a taxa de infecção natural de uma população de *L. columella* em área de várzea localizada no município de Itajubá, observaram que entre os fatores capazes de causar impacto na densidade populacional destes, estão as fortes chuvas e a drenagem dos criadouros. Apesar da drástica redução e desaparecimento dos moluscos, estes autores observaram que novos criadouros surgiram, demonstrando a

recuperação da população. As taxas de infecção natural por *F. hepatica* foram maiores nos meses de Setembro de 1999 e Julho de 2000, respectivamente 5,2% e 3,9%. Quando estas taxas foram relacionadas aos períodos de maior densidade populacional os autores indicaram a existência de uma correlação positiva entre estas.

2.2. Biologia

No meio ambiente, em áreas úmidas ou alagadiças e temperatura média acima de 10°C os ovos eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo ao entrarem em contato com a água passam por um desenvolvimento embrionário originando após um período médio de 12 e 14 dias a larva miracídio. Os miracídios, embriões piriformes e ciliados, são liberados dos ovos por estímulos térmicos e luminosos, necessários para a secreção de enzimas que digerem a substância que circunda o opérculo do ovo. No ambiente aquático o miracídio nada ativamente procurando pelo hospedeiro intermediário, molusco do gênero *Lymnaea*, onde penetra pelas partes moles para completar seu desenvolvimento. Assim que penetra no molusco o miracídio perde os cílios e transforma-se em esporocisto, um saco alongado formado por células germinativas, que cresce e origina no seu interior formas denominadas rédias. O esporocisto rompe-se liberando as rédias que migram para a glândula digestiva do molusco. Neste local as rédias, formas evolutivas que apresentam abertura bucal, esboço de tubo digestivo e células germinativas desenvolvem-

se podendo originar rédias de segunda geração dependendo das condições do ambiente, ou cercárias. As cercárias maduras abandonam as rédias pelo poro de nascimento e vão para os tecidos do molusco de onde emergem. O frio, a chuva e mudanças bruscas de temperatura da água estimulam a emergência das cercárias. No ambiente aquático as cercárias nadam ativamente e se fixa a um substrato onde perdem a cauda e encistam com o auxílio de substâncias secretadas pelas glândulas cistogênicas e ventrais, originando as formas infectantes, metacercárias. O período após a penetração do miracídio até a formação de metacercárias varia entre 45 a 60 dias sob condições favoráveis de temperatura e umidade (Silva *et al.*, 1980).

Os hospedeiros definitivos se infectam ao ingerirem as metacercárias encistadas na vegetação. No trato digestivo os vermes imaturos desencistam, atravessam as paredes do intestino delgado, alcançam a cavidade abdominal e normalmente migram até o fígado. Penetram no fígado pela cápsula hepática. Entre 35 a 45 dias as formas imaturas permanecem migrando pelo parênquima hepático formando túneis e alimentando-se de sangue e tecidos até alcançar os ductos biliares onde atingem a maturidade sexual. Em mais ou menos 60 dias após a infecção iniciam a postura dos ovos que passam via canal colédoco para os intestinos de onde são eliminados juntos com as fezes. Dependendo do hospedeiro definitivo os parasitos adultos podem produzir cerca de três a sete mil ovos por dia e permanecer no ducto biliar durante um a dois anos (Silva *et al.*, 1980; Beck, 1993).

2.3. Patogenia

A patogenia e sintomatologia provocadas por *F. hepatica* variam de acordo com fatores como carga parasitária, fase de desenvolvimento do parasito, tipo e idade do hospedeiro, localização e condição da pastagem, e época do ano. O desenvolvimento da doença é caracterizado na fase aguda pela presença dos parasitos jovens no parênquima hepático e na fase crônica pelos parasitos adultos nos ductos biliares (Boray, 1969).

Após ingestão as metacercárias desencistam no intestino delgado liberando as formas imaturas que iniciam suas migrações, abrindo caminhos para alcançarem a cavidade peritoneal e penetrarem no fígado. Durante este trajeto as formas imaturas causam lesões caracterizadas por escavações na área central das vilosidades, corrosões nas camadas mucosa, submucosa e muscular e destruição da serosa provocando micro-hemorragias devido aos pequenos pontos hemorrágicos que deixam ao atravessarem a parede intestinal. Chegando no fígado os parasitos jovens continuam suas migrações pelo parênquima hepático, destruindo o parênquima, provocando hemorragia e surgimento de áreas de necrose, devido principalmente ao traumatismo mecânico ocasionado pela ingestão de sangue e tecidos. Em geral, nesta fase os animais podem se apresentar fracos, com mucosas pálidas, dispnéicos e em alguns casos com fígado dilatado e palpável, associado à dor abdominal e ascite, sintomas característicos da fase aguda causadora de alta mortalidade.

Quando os parasitos alcançam a maturidade, penetram nos ductos biliares e iniciam suas migrações através do epitélio alimentando-se de sangue, ocasionando extensas áreas de erosão e necrose da mucosa, associadas a reações inflamatórias. Os ductos biliares aumentam de volume e freqüentemente ocorre hiperplasia das paredes. Nesta fase alguns dos sintomas são: anemia, palidez de mucosas, edema submandibular e ascite. Durante a fase crônica, além da hiperplasia das paredes dos ductos biliares, ocorre também à calcificação das lesões tissulares, estas mais evidentes em bovinos do que em ovinos (Silva *et al.*, 1980; Beck, 1993; Berne 1994).

2.4. Epidemiologia

Na natureza os índices de prevalência que ocorrem nas infecções por *F. hepatica* são acompanhados pelas características próprias de cada região, variando de acordo com as condições climáticas, ocorrência de áreas alagadiças, presença de hospedeiros vertebrados e principalmente pela presença de moluscos do gênero *Lymnaea* (Silva *et al.*, 1980; Beck, 1993).

No Brasil os limneídeos são encontrados normalmente em áreas irrigadas que oferecem condições adequadas à sua proliferação, como valas de irrigação, pastagens alagadiças e pantanosas, principalmente com águas lentas e superficiais (Silva *et al.*, 1980). Durante as estações chuvosas a presença dos limneídeos nestes ambientes facilita a sua disseminação e formação de novos criadouros.

Em condições climáticas favoráveis, como temperatura acima de 10°C, os ovos produzidos pelos moluscos, eclodem e uma nova geração de juvenis pode ser formada em apenas um mês. A população de moluscos aumenta durante as estações chuvosas e diminui após os períodos de frio e seca. Nos períodos em que as condições climáticas são desfavoráveis os moluscos podem sobreviver, entrando em estivação por vários meses (Silva *et al.*, 1980).

Além dos fatores que contribuem para a manutenção e infecção das populações de moluscos, o conhecimento sobre a espécie transmissora, quanto à suscetibilidade a aquisição e sucesso da infecção e qual seu papel na transmissão da doença nas diferentes regiões onde se encontram permitem a implantação de medidas de controle mais efetivas.

Gomes (1985), no Vale do Paraíba e região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, ao observar a ocorrência de *L. columella* naturalmente infectada por *F. hepatica*, avaliou experimentalmente a suscetibilidade destes à infecção com três e cinco miracídeos originados de ovos de *F. hepatica* de ovinos. Os resultados indicaram que nas infecções com três miracídeos o número de moluscos sobreviventes infectados foi maior que nas infecções com cinco ou mais miracídeos. A produção de metacercárias avaliada em ambas as infecções foi maior naquelas com três miracídeos. Com relação ao tamanho dos moluscos aqueles que mediram entre 3 e 5 mm adquiriram a infecção permitindo a multiplicação do parasito.

Dacal *et al.* (1988) ao avaliar a suscetibilidade de *L. columella* encontrada em quatro diferentes regiões do Estado de Minas Gerais comparando-as a amostras de localidades dos Estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul verificaram que estas foram igualmente suscetíveis à infecção por miracídios originados de ovos de *F. hepatica* proveniente de ovinos. Os mesmos autores analisaram a suscetibilidade dos moluscos quanto à infecção por seis, oito e dez miracídios. As análises dos resultados indicaram que todas as amostras se infectaram e não mostraram diferenças significativas quanto à exposição às diferentes quantidades de miracídios.

O estudo realizado por Boray (1978) comparando a alta suscetibilidade de *L. columella* e *L. viridis*, à infecção por *F. hepatica*, ocorrendo em uma região onde *L. tomentosa* é a espécie nativa, demonstra a capacidade dos limneídeos em colonizar diferentes regiões disseminando a doença. Ao verificar a ocorrência de *L. columella* em áreas de pastagem naturalmente infectada, Boray (1985) estudou em laboratório a suscetibilidade à infecção por *F. hepatica* em moluscos da mesma espécie, encontrados nas proximidades de duas áreas metropolitanas em uma mesma região. Os moluscos infectados experimentalmente mostraram-se suscetíveis, produzindo metacercárias viáveis. Estes resultados indicaram que *L. columella*, encontrada em áreas metropolitanas, vem se espalhando pela região podendo ter um importante papel na epidemiologia da fasciolose.

Na fasciolose, além de se considerar a suscetibilidade dos limneídeos à infecção com diferentes quantidades de miracídios, a espécie de hospedeiro

definitivo eliminando ovos viáveis em ambientes propícios ao seu desenvolvimento é igualmente importante podendo contribuir para o “sucesso” da infecção dos moluscos.

Jimenez-Albarran *et al.* (1977) coletaram ovos da vesícula biliar de ovelhas, vacas e cabras e incubaram a 26°C por 12 dias, até que miracídios fossem formados. Em seguida os autores compararam o desenvolvimento dos ovos de cada um dos hospedeiros, observando que o maior número de ovos capaz de formar miracídio foram os de vacas, no entanto o maior número de ovos viáveis (com miracídios liberados) foram os de ovelhas. Estes resultados permitiram aos autores concluir que a suscetibilidade do hospedeiro definitivo contribui para a transmissão da doença.

Rondelaud & Dreyfuss (1995), investigando a influência do hospedeiro definitivo sobre a prevalência da infecção de *L. truncatula* exposta a miracídios oriundos de ovos de diferentes hospedeiros demonstraram que os ovos originados de bovinos ou ovinos foram mais eficientes na transmissão da doença do que aqueles obtidos de coelhos. A prevalência da infecção dos moluscos foi de 35%, 66% e 86% nos grupos expostos a miracídios de coelho, ovino e bovino respectivamente.

Haroun & Hillyer (1986) ao associar o comportamento de *F. hepatica* no hospedeiro intermediário observaram que os ovos do parasito adulto são diretamente afetados pelas condições e tipo de hospedeiro definitivo nos quais estes se desenvolvem.

Segundo Hurtrez-Boussès *et al.* (2001), em algumas regiões a prevalência da infecção por *F. hepatica* é extremamente alta. Na América do Sul (Bolívia e Peru) a fasciolose é um sério problema de saúde pública, sendo a área que corresponde ao chamado Altiplano Boliviano, uma região onde a fasciolose humana é hiperendêmica com prevalência de 72 a 100%. Nesta região os ovinos e bovinos constituem os principais reservatórios e asininos e suínos são considerados hospedeiros secundários (Valero *et al.*, 2000). Já no continente Europeu os suínos são considerados reservatórios ocasionais (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). No mesmo continente, Ménard *et al.* (2000), demonstrou a suscetibilidade de hospedeiros silvestres lagomorfos *Oryctolagus cuniculus* e roedores *Myocastor coypus*, encontrando uma taxa de infecção natural de respectivamente 34 e 55%. No Brasil Costa *et al.* (1987), apontaram o *Myocastor coypus* como um dos principais reservatórios e provavelmente disseminador de *F. hepatica* na Estação Experimental Zootécnica de Dom Pedrito, no Estado do Rio Grande do Sul.

Evidências sobre a variabilidade morfológica de ovos de *F. hepatica* relacionando a espécie de hospedeiro e sua região de origem, foram investigadas por Abrous *et al.* (1998), a partir dos dados encontrados na literatura de alguns países europeus. Os resultados mostraram que os ovos encontrados em roedores e lagomorfos eram menores que aqueles encontrados em ruminantes. A relação entre as diferenças de tamanho dos ovos e espécie de hospedeiro foi observada com a passagem dos ovos de *F. hepatica* de bovino em ratos e em coelhos. Estes resultados permitiram aos

autores verificar que a espécie de hospedeiro é o principal componente da variabilidade morfológica de ovos de *F. hepatica* e que a distribuição geográfica não parece ser um fator que venha a contribuir com essa variabilidade.

Vaughan *et al.* (1997) descreveram dois casos de animais naturalmente parasitados por *F. hepatica* em que os ovos encontrados nas fezes foram considerados irregulares no tamanho e forma quando comparados com os de outros animais. A explicação para este fato segundo os autores é que os animais em questão, emus (*Dromaius novaehollandiae*) eram vertebrados representantes da Classe das Aves.

A relação entre o hospedeiro definitivo e o parasito pode também ser observada quando este é exposto a diferentes cargas parasitárias. Helfer & Knapp (1968), trabalhando com a infecção de *Meriones unguiculatus* com a finalidade de determinar um novo modelo experimental para *F. hepatica* demonstraram a suscetibilidade destes expondo-os a infecção com 1, 2, 4, 8, 16 e 20 metacercárias. De acordo com os autores, nas infecções com 20 metacercárias todos animais morreram entre o 27° e 33° dias após a infecção. Nas infecções com 4, 8 e 16 metacercárias as mortes ocorreram entre o 26° e 36° dias de infecção. Os animais infectados com 1 e 2 metacercárias sobreviveram por até 55 dias, final do experimento.

2.5. Diagnóstico

2.5.1. Diagnóstico parasitológico

Na fase crônica da doença em rebanhos de bovino, ovino e de bubalinos ou em outros animais naturalmente e/ou experimentalmente infectados como, porcos, coelhos, ratos, hamsters e outros, ou nas infecções humanas, *F. hepatica* pode ser diagnosticada através do encontro de ovos nas fezes (Boray, 1969).

No diagnóstico parasitológico, a detecção de ovos nas fezes pode ser feita utilizando-se a técnica de processamento pela filtração seqüencial em dois tamises ou “Flukefinder” ou a técnica de quatro tamises metálicos modificada (Girão & Ueno, 1982). Faria (2000), ao comparar a utilização destas para o diagnóstico quantitativo e qualitativo de ovos de *F. hepatica* observou uma ótima concordância demonstrando a validade de ambas em prever a ocorrência da infecção. No entanto, a técnica de quatro tamises metálicos modificada apresentou melhor operacionalidade devido a sua maior praticidade quanto ao material e tempo gastos na sua execução.

Na fase aguda ou subaguda não são detectados ovos nas fezes, porém as lesões patológicas características da infecção já estão presentes. O diagnóstico baseia-se no uso de testes laboratoriais que permitam detectar enzimas liberadas no sangue que caracterizam a infecção no parênquima hepático e lesão dos ductos biliares (Berne, 1994).

Nos achados de necropsia o diagnóstico da fasciolose se dá pelo encontro dos parasitos. Em geral, com a presença das formas jovens no parênquima hepático durante a fase aguda, e presença das formas adultas nos ductos biliares na fase crônica (Boray, 1969).

2.5.2. Diagnóstico hematológico

Na fasciolose, Keegan & Trudgett (1992) pesquisando células do sangue periférico, mostraram a ocorrência durante a infecção do aumento de células polimorfonucleares e profunda eosinofilia. Em cortes histológicos do parênquima hepático os autores descreveram a presença de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos circundando o parasito durante sua migração.

Milbourne & Howell (1990), avaliando alterações celulares do sangue periférico de ratos e camundongos infectados por *F. hepatica* observaram que em ambos animais ocorrem aumento no número de eosinófilos durante a infecção. Nos ratos, o número de eosinófilos no início da infecção não apresentou alterações significativas. Os autores relataram um aumento acentuado aos 21 dias após a infecção. Nos camundongos, as observações encontradas mostraram um aumento significativo no número de eosinófilos logo após o início da infecção, ocorrendo após sete dias de infecção um pico de eosinófilos.

2.6. *Fasciola hepatica* em hospedeiro primata não humano

Tomimura *et al.* (1975), estudaram o desenvolvimento da *Fasciola hepatica* em onze macacos do gênero *Macaca*. Estes hospedeiros mostraram-se altamente suscetíveis à infecção. O período pré-patente foi significativamente longo para *M. nemestrina* e *M. irus* que para a espécie *M.*

cyclopis, respectivamente 96, 89 e 51 dias. Os autores atribuíram essas variações às diferenças de suscetibilidade entre as espécies dos hospedeiros. Durante o experimento seis animais infectados com 100 ou mais metacercárias morreram com 48 a 80 dias após a infecção. Em três destes animais, cujas mortes ocorreram entre 50 a 75 dias após a infecção, os autores demonstraram relativa perda no conteúdo de eritrócitos pouco antes da morte. Os achados da necropsia indicaram como causa das mortes uma hemorragia interna afetando o número de eritrócitos. Foram observadas alterações na resposta celular contra os parasitos. Segundo os autores, todos os animais apresentaram mudanças proeminentes em relação aos eosinófilos. No início da infecção as contagens de eosinófilos apresentavam-se baixa havendo aumento durante a fase de migração do parasito pelo parênquima hepático e queda gradativa com a entrada destes nos ductos biliares.

No Brasil, Coelho (2001) com o objetivo de avaliar a dinâmica de infecções de *L. columella* por *F. hepatica* infectou experimentalmente dois sagüis da espécie *Callithrix penicillata* fechando o ciclo do parasito.

2.7. *Fasciola hepatica* em gerbil

Helfer & Knapp (1968), avaliaram o emprego de gerbil (*Meriones unguiculatus*) como um novo modelo experimental para estudo da patologia de *F. hepatica*, realizando dois experimentos. No primeiro experimento os autores infectaram quatro animais com vinte metacercárias de *F. hepatica*. No segundo

experimento os autores utilizaram dez divididos em cinco grupos, cada um com dois animais infectados, respectivamente, com uma, duas, quatro, oito e dezesseis metacercárias de *F. hepatica*.

Segundo os autores, ambos os grupos apresentaram lesões no fígado semelhantes às encontradas na infecção de coelhos. A necropsia dos animais mostrou a presença de alterações macroscópicas descritas por focos de necrose, fibrose, hiperplasia dos ductos biliares e traumatismo hepático. Foi recuperado um parasito no ducto biliar de um animal infectado com vinte metacercárias, aos 31 dias após a infecção. As alterações microscópicas revelaram infiltrado inflamatório ao redor de vasos, proliferação dos ductos biliares, áreas de hemorragia, necrose e fibrose. Foi observado um parasito no corte histológico do parênquima hepático de um animal também infectado com vinte metacercárias aos 27 dias após a infecção.

3. JUSTIFICATIVA

Dentre os helmintos de importância médica e veterinária a *F. hepatica* é um importante trematódeo devido às expressivas perdas econômicas que acarreta a exploração pecuária assim como também por tratar-se de uma zoonose que está em franca expansão em varias regiões do Brasil.

Estudos sobre o parasitismo de diferentes tipos de hospedeiros vertebrados, como roedores e primatas não humanos além, de proporcionar um melhor entendimento sobre o comportamento e desenvolvimento de *F. hepatica* em outros hospedeiros podem contribuir para o conhecimento das espécies suscetíveis auxiliando na escolha de um animal de laboratório para a manutenção do ciclo biológico do parasito. Igualmente importante é o estudo da interação entre os diferentes tipos de hospedeiros vertebrados e a influência destes no desenvolvimento do parasito no hospedeiro intermediário, avaliando a eliminação de cercárias e formação de metacercárias, contribuindo com a transmissão da doença. Estes estudos ampliam as discussões sobre a importância de um hospedeiro para trabalho em laboratório de fácil manutenção e conseqüentemente com custos mais acessíveis.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

- Estudar o comportamento e desenvolvimento de uma cepa de *F. hepatica* de bovinos naturalmente infectados do município de Itajubá, Estado de Minas Gerais, em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*).

4.2. Objetivos específicos

- Observar e avaliar o desenvolvimento de *F. hepatica* de bovinos naturalmente infectados através da eliminação de ovos do parasito após a passagem em *C. penicillata* e passagem de *C. penicillata* em *M. unguiculatus* infectados experimentalmente.
- Observar as características morfológicas de ovos de *F. hepatica* de bovinos naturalmente infectados após passagem em *C. penicillata* e passagem de *C. penicillata* em *M. unguiculatus*.
- Observar e avaliar a produção dos estádios evolutivos de *F. hepatica* na infecção experimental de *Lymnaea columella* por miracídios de ovos de diferentes hospedeiros.

- Observar alterações patológicas macroscópicas e microscópicas na infecção experimental de *M. unguiculatus* por três, cinco e oito metacercárias de *F. hepatica* de bovinos naturalmente infectados.
- Observar o perfil hematológico, através do hematócrito e contagens total e diferencial, de células do sangue periférico, na infecção experimental de *M. unguiculatus* por três, cinco e oito metacercárias de *F. hepatica* de bovinos naturalmente infectados.
- Avaliar a utilização de *C. penicillata* e *M. unguiculatus* como animais de laboratório para manutenção do ciclo biológico de *F. hepatica*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Manutenção do ciclo de *F. hepatica* em laboratório

A criação de *Lymnaea columella* originados de posturas de moluscos coletados no município de Itajubá, Estado de Minas Gerais, foi mantida no laboratório de Helminologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os moluscos foram mantidos em temperatura ambiente, em cubas de plástico de tamanho 25x 6x 10cm contendo 500ml de água desclorada e placas de isopor de 5x 5x 1cm para realização de posturas. Semanalmente foram alimentados com folhas de alface, e realizadas as limpezas das cubas.

As placas com posturas foram transferidas para cubas semelhantes às anteriores, contendo água desclorada, para desenvolvimento dos moluscos. A cada 30 dias, cerca de 45 a 90 moluscos medindo entre 4 a 8mm, originados das posturas, foram retirados das cubas e utilizados para manutenção do ciclo biológico através da infecção por miracídios recuperados de ovos *F. hepatica* de bovinos oriundos da mesma região de coleta destes.

Os ovos foram obtidos com a realização do exame das fezes dos bovinos utilizando-se a técnica de Girão & Ueno (1982), descrita no item 5.3. Após obtenção dos ovos, estes foram colocados em placas de Petri e incubados a 27°C para desenvolvimento e formação do miracídio. A partir do oitavo dia de incubadas, as placas com ovos foram diariamente observadas sob microscópio estereoscópio no aumento de 100X com a finalidade de acompanhar a

formação dos miracídios. As placas contendo ovos com miracídios foram colocadas sob foco de luz com lâmpada de 60 watts, a uma distância de 50 cm, por um período de quatro horas, para estimular a eclosão destes. Os miracídios eclodidos foram recolhidos com o auxílio de uma pipeta capilar e utilizados na infecção dos moluscos *L. columella*, procedimento descrito no item 5.4.; 1. Infecção de moluscos.

Sessenta dias após a infecção os moluscos foram sacrificados, para obtenção de cercárias e metacercárias, procedimentos descritos nos itens 5.4.2 e 5.4.3. Após o encistamento, as placas com metacercárias foram devidamente etiquetadas e armazenadas em geladeira a 4°C para uso posterior.

5.2. Animais

5.2.1. Infecção de *Callithrix penicillata*

Três animais da espécie *Callithrix penicillata* (Primates, Callitrichidae) cedidos pelo Laboratório de Primatas do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas -ICB, UFMG, foram infectados individualmente com dez metacercárias (Mc) de *F. hepatica* oriundas de bovinos naturalmente infectados. A infecção foi realizada inoculando via oral as metacercárias, suspensas em água desclorada, diretamente na porção final da cavidade bucal dos animais com o auxílio de uma pipeta volumétrica de 250 µl. Após a inoculação os animais foram mantidos no Laboratório de Primatas em gaiolas

individuais com fundo forrado por papel jornal e alimentados com ração comercial para cães, banana, maçã, mamão e água trocada diariamente.

As metacercárias foram obtidas de acordo com a metodologia descrita nos itens 5.4.2. e 5.4.3.

5.2.2. Infecção de *Meriones unguiculatus*

Foram utilizados 20 animais com idade de 10 semanas, peso médio de 60g e ambos os sexos. Estes foram divididos aleatoriamente em dois grupos denominados grupos **GI** e **GNI**. O grupo **GI** foi formado por 15 animais, oito machos e sete fêmeas, infectados individualmente com cinco metacercárias (Mc) de *F. hepatica* de bovinos após a passagem em *C. penicillata*, obtidas também de acordo com a metodologia descrita nos itens 5.4.2. e 5.4.3. A infecção foi realizada inoculando via oral na porção final da cavidade bucal as formas infectantes suspensas em água desclorada com auxílio de uma pipeta volumétrica de 200 µl. O grupo **GNI** foi formado por cinco animais, três machos e duas fêmeas, não infectados. Estes receberam individualmente por via oral 0,5 ml de solução salina. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, separados por sexo em duas gaiolas coletivas com fundo forrado por papel jornal, alimentados com ração comercial para roedores (Ração Labina – Purina) e recebendo água trocada a cada dois dias.

5.3. Coleta de fezes e exame coprológico para obtenção de ovos

Trinta dias após o período pré-patente foram realizadas coletas das fezes dos *C. penicillata* e *M. unguiculatus* infectados experimentalmente. Diariamente o papel jornal que forrava cada uma das gaiolas destes animais foram substituídos. As fezes depositadas no papel jornal retirado foram coletadas com o auxílio de um pinça. Estas foram colocadas em copos plásticos devidamente etiquetados e transportadas em caixas de isopor para o Laboratório de Helminologia Veterinária, onde foi realizado o exame de fezes para obtenção de ovos de *F. hepatica*.

Fezes dos *C. penicillata* infectados foram coletadas, processadas e examinadas. Após determinar o período pré-patente na infecção dos três animais foram realizadas contagens diárias do número de ovos por grama de fezes (OPG) de um dos animais. As contagens foram realizadas a partir do 30º dia após o período pré-patente até 360 dias, final do experimento.

Fezes dos *M. unguiculatus* infectados foram coletadas diariamente de cada uma das gaiolas formando-se um “pool” de fezes dos animais machos e um “pool” de fezes dos animais fêmeas, examinadas e realizadas contagens do OPG de cada “pool” individualmente. Assim que foram encontrados os primeiros ovos os animais foram colocados em gaiolas individuais com a finalidade de detectar a positividade da infecção em cada animal. Fezes de cada um dos animais positivos foram examinadas e realizadas contagens

diárias, a partir do 30º dia até 226 dias após o período pré-patente, do OPG de cada um destes animais.

Fezes de cinco bovinos naturalmente infectados foram coletadas em uma fazenda do município de Itajubá, Estado de Minas Gerais, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixa de isopor até o laboratório de Helminologia Veterinária. Estas foram homogeneizadas formando-se um “pool” para o processamento e obtenção dos ovos de *F. hepatica*.

Os exames de fezes para pesquisa de ovos de *F. hepatica* de todos os animais foram realizados utilizando-se a técnica de Girão & Ueno (1982), para diagnóstico quantitativo e qualitativo de ovos de *F. hepatica*. Esta técnica consiste em pesar até quatro gramas de fezes que foram colocadas em copos plásticos e homogeneizadas com o auxílio de um bastão de vidro acrescentando 30ml de água desclorada. Após a homogeneização por 2 minutos a mistura foi vertida em um conjunto de tamises de malhas variadas com aberturas de 174, 96, 87 e 65µm, dispostos uns sobre os outros em ordem decrescente de aberturas e lavada em água corrente. Após lavagem contínua o material retido no último tamis foi recolhido em um Becker utilizando-se um jato de água no sentido inverso. Em seguida, este foi transferido para um tubo de ensaio de 30ml e deixado por cinco minutos para sedimentação. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de pipeta de Pasteur e o material homogeneizado com jato de água sobre o tubo. Os processos de retirada do sobrenadante e homogeneização do material foram repetidos por mais oito

vezes a cada cinco minutos. Após a limpeza final, o sedimento foi homogeneizado, transferido para placas de Petri e observado sob microscópio estereoscópio no aumento de 100X para coleta e contagem dos ovos de *F. hepatica*. Foram contados os ovos eliminados no “pool” de fezes dos bovinos naturalmente infectados, nas fezes de cada um dos *C. penicillata* infectados experimentalmente, no “pool” das fezes de cada uma das gaiolas dos animais machos e dos animais fêmeas *M. unguiculatus* e nas fezes de cada um dos *M. unguiculatus* positivos infectados experimentalmente. Depois de contados os ovos foram transferidos para novas placas de Petri contendo água desclorada, devidamente etiquetadas e colocados em estufa a 27°C para desenvolvimento de miracídios.

5.4. Obtenção dos estádios evolutivos

5.4.1 Miracídios

A partir do oitavo dia de incubadas as placas com os ovos de *F. hepatica* de cada um dos hospedeiros foram diariamente observadas sob microscópio estereoscópio no aumento de 150X com a finalidade de verificar a formação de miracídios.

Assim que foram observados ovos com miracídios as placas foram colocadas sob um foco de luz com lâmpada de 60 watts, a uma distância de 50 cm, por um período de quatro horas, para estimular a eclosão dos miracídios.

Os miracídios eclodidos foram recolhidos com o auxílio de uma pipeta capilar sob microscópio estereoscópio no aumento 100X e utilizados na infecção de *L. columella* para obtenção dos estádios evolutivos de *F. hepatica*.

1. Infecção de moluscos

Foram utilizados 900 moluscos *L. columella* medindo entre 4-8mm, criados no laboratório de Helminologia Veterinária, divididos em três grupos denominados grupos I, II e III, formados cada um por 300 moluscos. Os animais dos grupos I, II e III foram infectados individualmente por quatro miracídios originados de ovos de *F. hepatica* de bovinos naturalmente infectados após a passagem em *C. penicillata*; após a passagem em *C. penicillata* e *M. unguiculatus* e de bovinos naturalmente infectados, respectivamente.

A infecção dos moluscos foi realizada utilizando-se ¹placas de cultura de 12 poços. Cada molusco foi medido com o auxílio de um paquímetro e em seguida transferido individualmente para um poço da placa de cultura. Em cada poço foram colocados 2 ml de água desclorada e quatro miracídios, recuperados como descrito no item 5.4.1., originados de ovos de *F. hepatica* dos três hospedeiros.

A cada infecção foram utilizadas nove placas de cultura. Os poços de cada uma das placas foram examinados sob microscópio estereoscópio com a finalidade de certificar a presença dos quatro miracídios e a infecção dos moluscos. Os moluscos foram mantidos nas placas de cultura por um período

de 24 horas sob um foco de luz com lâmpada de 60 watts, a uma distância de 50 cm. Após esse período, moluscos de cada um dos grupos foram transferidos para 15 cubas de plástico, cada uma com 20 indivíduos, de tamanho 25x 6x 10cm contendo água desclorada, formando os grupos I, II e III. Os moluscos foram mantidos em temperatura ambiente, semanalmente alimentados com folhas de alface e a limpeza das cubas realizada.

O grupo controle foi formado por 100 indivíduos não infectados. Estes foram divididos em cinco cubas de plástico, no tamanho já citado, cada uma com 20 moluscos, mantidos nas mesmas condições.

Moluscos dos grupos I, II e III e grupo controle foram utilizados para avaliar a produção dos estádios evolutivos de *F. hepatica*, procedimento descrito no item 5.5.

5.4.2. Cercárias

Para verificar a emergência das cercárias 50 dias após a infecção, cinco moluscos infectados com miracídios originados de ovos de *F. hepatica* de bovinos; de bovinos após a passagem em *C. penicillata* e de bovinos após a passagem em *C. penicillata* e *M. unguiculatus* foram submetidos a choque térmico e luminoso. Os moluscos foram colocados isoladamente em placas de Petri forradas com papel celofane, contendo 20ml de água desclorada sob um foco de luz com lâmpada de 60 Watts a uma distância de 50cm por duas horas. Durante este período, em intervalos de 30 minutos, as placas com moluscos

foram examinadas sob microscópio estereoscópio no aumento de 100X com o objetivo de verificar a emergência espontânea de cercárias.

5.4.3. Metacercárias

As metacercárias foram obtidas a partir das cercárias que encistaram no papel celofane ou no fundo das placas de Petri. Após 24 horas de encistadas, sob microscópio estereoscópio no aumento de 100X estas foram contadas, retiradas com o auxílio de um estilete, coletadas com pipeta capilar e transferidas para tubos de ensaio de 5ml com água desclorada e mantidas em geladeira a 4°C para uso posterior.

Os moluscos que não eliminaram cercárias logo após serem submetidos aos procedimentos do choque térmico e luminoso foram colocados em novas cubas de plástico e após 60 dias de infecção foram sacrificados. Estes foram colocados em placas de Petri com água desclorada e tiveram a concha esmagada utilizando-se bastão de vidro. Em seguida foram dissecados com o auxílio de estiletos e as placas observadas sob microscópio estereoscópio no aumento de 100X para pesquisa dos estádios evolutivos. Os estádios evolutivos obtidos destes moluscos foram contados, retirados e transferidos para tubos de ensaio de 5ml com água desclorada. Estes foram armazenados em geladeira a 4°C para uso posterior.

5.5. Estádios evolutivos de *F. hepatica* na infecção experimental de *L. columella*

A produção dos estádios evolutivos foi determinada pelo número médio de formas obtidas por moluscos que formaram os grupos I, II e III, entre 60 a 74 dias após a infecção dos 900 moluscos *L. columella* citados no item 5.4.; 1. Infecção de moluscos.

5.6. Variabilidade morfológica de ovos de *F. hepatica*

Para o estudo da variabilidade morfológica foram obtidas as medidas de comprimento e largura de 100 ovos de *F. hepatica* originados da infecção natural de bovinos; 100 ovos de *F. hepatica* após passagem em *C. penicillata* e 100 ovos de *F. hepatica* após passagem de *C. penicillata* em *M. unguiculatus*. A análise morfométrica foi realizada utilizando-se microscópio óptico com ocular micrométrica no aumento de 100X.

5.7. Alterações patológicas

Para observação das alterações patológicas macroscópicas e microscópicas na infecção de *M. unguiculatus* por *F. hepatica* exposto a diferentes cargas parasitárias, foram utilizados 190 animais de ambos os sexos,

com idade entre 8 e 9 semanas e peso médio de 58g. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, denominados da seguinte forma:

- Grupo **G3Mc**, com 60 animais infectados com três metacercárias;
- Grupo **G5Mc** com 60 animais infectados com cinco metacercárias;
- Grupo **G8Mc** com 60 animais infectados com oito metacercárias;
- Grupo **GSI** com 10 animais não infectados.

Os animais dos grupos **G3Mc**, **G5Mc** e **G8Mc** foram infectados respectivamente com três, cinco e oito metacercárias (Mc) provenientes de *F. hepatica* de bovinos naturalmente infectados após passagem em *C. penicillata*. O grupo controle, **GSI**, foi utilizado como grupo controle. Os animais foram inoculados via oral com 0,5 ml de solução salina. As metacercárias foram diluídas em 0,5 ml de água desclorada e inoculadas individualmente na cavidade oral utilizando-se pipeta volumétrica de acordo com a metodologia do item 5.2.2..

5.7.1. Alterações macroscópicas e microscópicas

As alterações macroscópicas dos órgãos internos (fígado, intestino delgado e pulmões) foram observadas através de necropsias realizadas aos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 dias após infecção. A cada intervalo de dez dias foram sacrificados seis animais de cada um dos grupos, **G3Mc**, **G5Mc** e **G8Mc** e um animal do grupo controle **GSI**. Os animais foram anestesiados por

inalação ao éter sulfúrico e em seguida sacrificados. Cada animal foi colocado em uma caixa plástica de tampa transparente com um chumaço de algodão embebido com éter sulfúrico. Antes que ocorresse a parada respiratória o animal foi retirado da caixa e realizada a secção da aorta torácica. Em seguida os animais foram necropsiados.

As observações macroscópicas foram analisadas seguindo os parâmetros de Dawes (1963a, 1963b, 1963c) e Sinclair (1967).

Para observação das alterações microscópicas foram retirados fragmentos dos órgãos que apresentaram alterações. Estes foram fixados em solução de formol a 10%. Posteriormente foram feitas desidratação em álcool e diafanização em xilol; os tecidos foram incluídos em parafina e realizados cortes de cinco micrômetros. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Gomori e Azul da Prússia, para exame histopatológico.

5.7.2. Perfil hematológico

Antes do sacrifício e realização das necropsias, a cada intervalo de dez dias após a infecção, foram feitas coletas de sangue do plexo retroorbital de cada um dos animais dos grupos **G3Mc**, **G5Mc**, **G8Mc** e um animal do grupo controle.

O hematócrito foi determinado pelo método do micro hematócrito, usando tubos capilares sem anticoagulante, vedados com plasticina e centrifugados por cinco minutos em ultracentrífuga para micro hematócrito.

Para a contagem global de leucócitos segundo a técnica descrita no livro de Ferreira Neto et al. (1982), alíquotas de 0,02 ml de sangue foram diluídas 1:20 em solução de Turk, sendo feita contagens das células em câmara de Neubauer e contador manual. O número de células foi multiplicado pelo fator de correção da câmara e diluição da amostra, sendo expresso por mm^3 de sangue.

Para as contagens diferenciais de leucócitos segundo a técnica descrita por Ferreira Neto et al. (1982), foram realizados esfregaços sanguíneos corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. Foram contadas 200 células em cada lâmina e o número de cada tipo celular calculado a partir da percentagem encontrada em relação ao número total de células.

6. Análise estatística

As análises dos resultados foram realizadas com a utilização dos pacotes estatísticos MINITAB, PRISMA e software R 2.2.1.

As contagens de ovos de *Fasciola hepatica* na infecção experimental dos *C. penicillata* e *M. unguiculatus* foram interpretados através da Análise de Regressão utilizando teste de autocorrelação e correlação, respectivamente. Para estimar a probabilidade de ocorrência de ovos de *F. hepatica* na infecção experimental dos *M. unguiculatus* foi utilizado o Modelo de Regressão Logística.

Para avaliar o comportamento dos estádios evolutivos de rédias e metacercárias e testar a interação entre as variáveis, tipo de hospedeiro e tempo de infecção foi utilizado o Modelo de Poisson e software R 2.2.1.

As medidas de comprimento e largura dos ovos de *F. hepatica* originados da infecção natural de bovinos e experimental dos *C. penicillata* e *M. unguiculatus* foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA).

Os parâmetros hematológicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), Bonferroni's Multiple Comparison Test, através do pacote estatístico PRISMA.

7. RESULTADOS

7.1. Dinâmica da eliminação de ovos de *F. hepatica* na infecção de *C. penicillata*

Os primatas *Callithrix penicillata* mostraram-se suscetíveis à infecção pela cepa de *Fasciola hepatica* de bovinos.

A partir do trigésimo dia após o período pré-patente, foram realizadas contagens diárias do número de ovos de *F. hepatica* por grama de fezes eliminados na infecção experimental dos *C. penicillata*. Os períodos pré-patentes foram de 42, 45 e 47 dias para os três animais com uma média de $44,3 \pm 2,51$ dias após a infecção. As primeiras contagens do OPG foram em média de três ovos para cada um, dos animais. A FIGURA 1 mostra os valores médios das contagens do número de ovos eliminados por um dos *C. penicillata*, em intervalos de 30 dias após o período pré-patente até 360 dias.

Trinta dias após o período pré-patente observou-se um aumento gradativo nos valores médios do número de ovos eliminados até os 120 dias.

Nos intervalos seguintes até os 180 dias ocorreu uma diminuição no valor médio do número de ovos eliminados com diferença significativa em relação aos intervalos anteriores e subsequentes.

Após este período foi observado um novo aumento nas contagens de ovos até os 270 dias que mantiveram valores semelhantes nos intervalos subsequentes até o final do experimento aos 360 dias.

Os testes de correlação mostraram que as comparações dos valores médios do número de ovos eliminados nos intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 dias apresentaram diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$); enquanto entre

os intervalos de 30 e 180, 60 e 150, 120 e 360, 150 e 240 e de 270 a 360 dias não ocorreram diferenças significativas nos valores médios do número de ovos eliminados ao longo do tempo ($p > 0,05$).

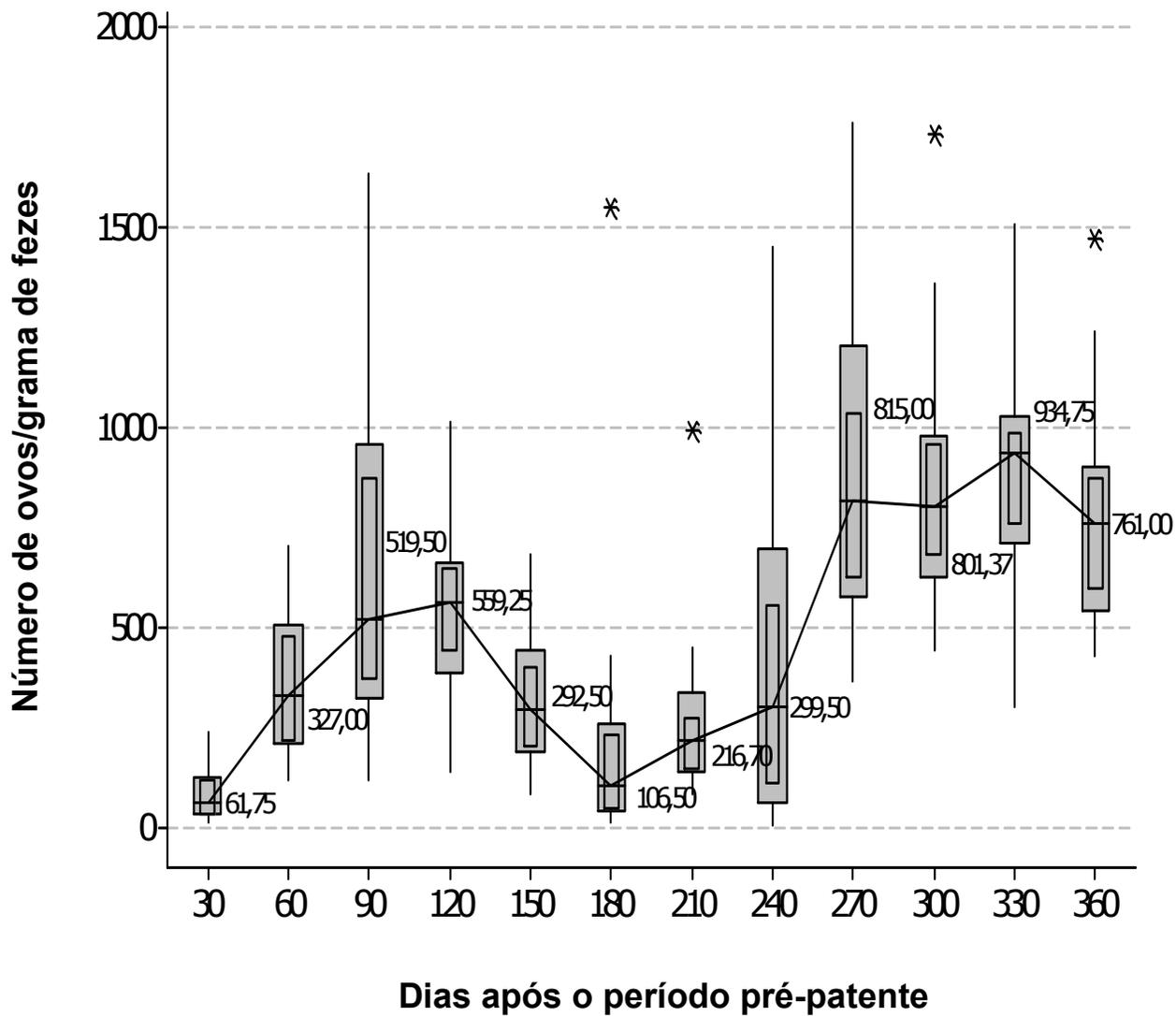


FIGURA 1- Valores médios das contagens de ovos por grama de fezes de *Fasciola hepatica* oriunda de *Callithrix penicillata*.

* Outline

7.2. Dinâmica da eliminação de ovos de *F. hepatica* na infecção de *M. unguiculatus*

O encontro dos primeiros ovos de *F. hepatica* no “pool” das fezes dos animais machos e no “pool” das fezes dos animais fêmeas ocorreu aos 53 dias após a infecção. Foram contados dois ovos no “pool” das fezes dos animais machos e um ovo no “pool” das fezes dos animais fêmeas.

A positividade da infecção foi observada em 46,6% dos animais, sendo estes quatro machos e três fêmeas. Na TABELA 1 encontram-se os valores médios das contagens do OPG dos animais positivos realizadas em intervalos de 30 dias até 226 dias após o período pré-patente. As comparações entre os valores médios do número de ovos eliminados pelos animais positivos mostraram que os valores obtidos nos intervalos de 30 a 60 dias após o período pré-patente foram inferiores aos encontrados entre os intervalos de 60 a 180 dias e superiores após os 180 dias.

A partir dos valores médios do número de ovos observados foram estimadas as probabilidades da ocorrência de ovos de *F. hepatica* nas fezes dos *M. unguiculatus* durante o tempo de estudo. Os testes de estimativas de probabilidade mostraram que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios estimados e observados, $p \leq 0,05$.

A FIGURA 2 ilustra a relação entre estes valores indicando que a probabilidade de ocorrência de ovos de *F. hepatica* na infecção experimental de cada um dos *M. unguiculatus* nos intervalos do tempo apresentam comportamento semelhante aos resultados observados nas contagens

realizadas. Ao longo do tempo os valores estimados para a probabilidade de ocorrência de ovos de *F. hepatica* obtidos na infecção experimental dos *M. unguiculatus* nos intervalos entre 30 a 60 dias foram inferiores aos obtidos entre os intervalos de 60 a 180 dias e superiores após os 180 dias.

TABELA 1- Valores médios das contagens do OPG dos *Meriones unguiculatus* positivos, realizadas em intervalos de 30 dias até 226 dias após o período pré-patente.

Intervalos após o período pré-patente	Animais positivos e número de ovos eliminados nas fezes em cada um dos intervalos de observação							Valor médio do OPG
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	
30	4	1	3	3	2	3	2	2,6
60	0	3	3	3	1	0	2	1,7
90	5	3	5	6	5	5	7	5,1
120	5	4	6	2	2	3	4	3,7
150	3	4	4	2	5	3	2	3,3
180	5	4	6	3	4	4	4	4,3
210	1	2	0	0	0	0	0	0,4
226	0	1	0	1	0	0	1	0,4

G1 (Gerbil número um) a G7 (Gerbil número sete); Valores médios do numero de ovos eliminados nas fezes dos animais positivos nos intervalos de 30 a 60 dias (_ _ _); de 60 a 180 (____) e após 180 dias até 226 dias do período pré-patente (.....).

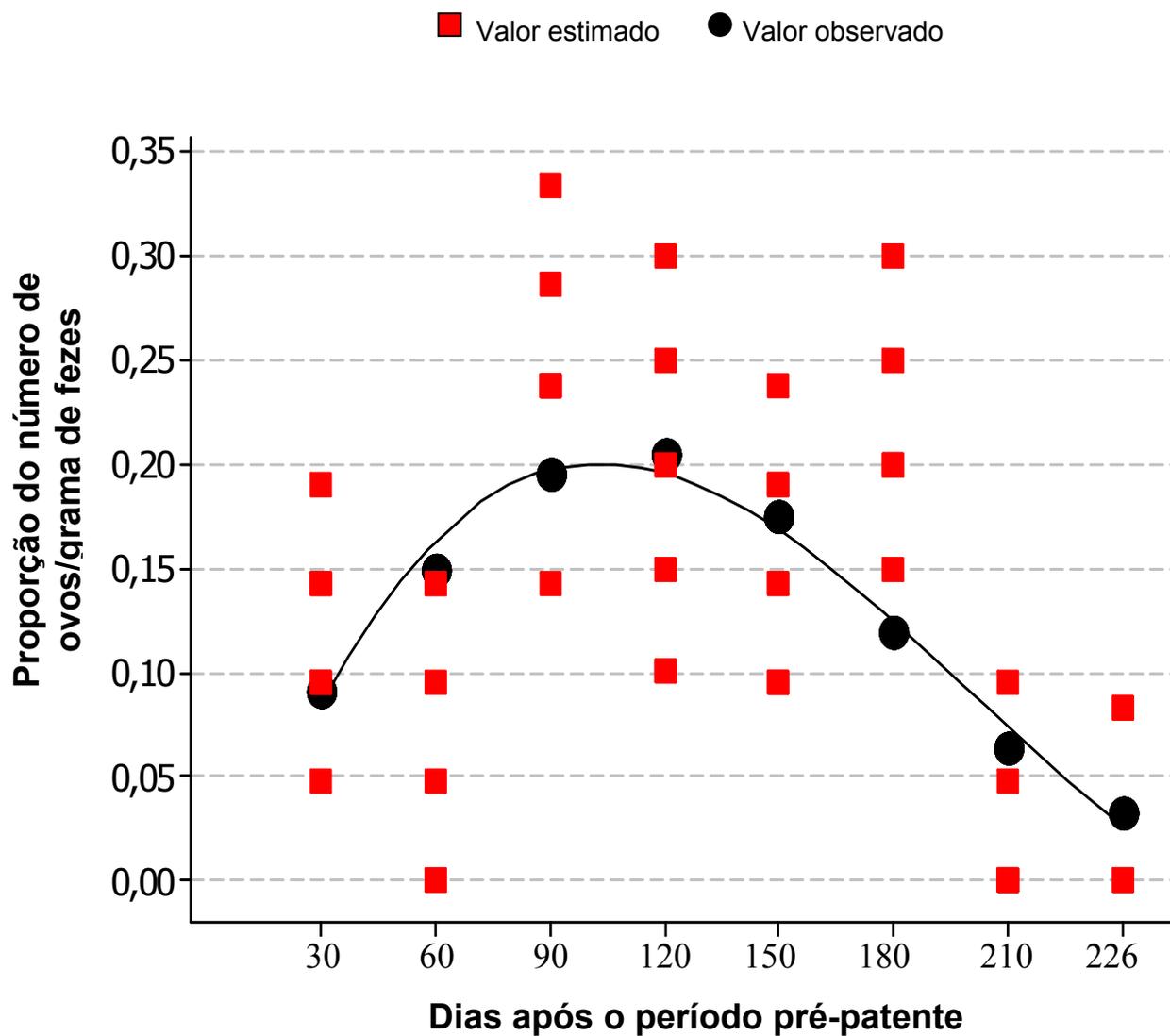


FIGURA 2 – Proporção dos valores médios observados e estimados para a probabilidade de ocorrência de ovos de *Fasciola hepatica* oriunda de *Meriones unguiculatus*.

7.3. Variabilidade morfológica dos ovos de *F. hepatica*

Na TABELA 2 podem ser, observados os valores médios das medidas de 100 ovos de *F. hepatica* originados de bovinos naturalmente infectados; 100 ovos após a passagem em *C. penicillata* e 100 ovos após a passagem em *M. unguiculatus*.

Nas comparações entre as médias das medidas de comprimento de ovos de *F. hepatica* oriunda dos três hospedeiros foram observadas diferenças significativas ($p < 0,00001$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre as médias das medidas de largura dos ovos de *F. hepatica* oriunda dos três hospedeiros ($p = 0,07$).

Os ovos de *F. hepatica* oriundos de bovinos naturalmente infectados apresentaram comprimento maior em relação aos ovos originados na infecção experimental de *C. penicillata*.

A comparação entre o comprimento dos ovos de *F. hepatica* oriunda de bovinos em relação aos ovos de *F. hepatica* oriunda de *M. unguiculatus* experimentalmente infectados mostrou que entre estes também ocorreram diferenças significativas. Ovos de *F. hepatica* oriunda de bovinos apresentaram comprimento maior em relação aos ovos de *F. hepatica* oriunda de *M. unguiculatus*.

Ovos de *F. hepatica* eliminados na infecção experimental de *C. penicillata* infectados experimentalmente também apresentaram comprimento maior em relação aos ovos de *F. hepatica* oriunda de *M. unguiculatus*.

TABELA 2 – Medidas de comprimento e largura de ovos de *Fasciola hepatica* oriunda de bovinos, de *Callithrix penicillata* e *Meriones unguiculatus*.

Tipo de hospedeiro	Número de animais	Número de ovos examinados	Média em $\mu\text{m} \pm$ desvio padrão	
			Largura	Comprimento
Bovinos	5	100	73,131 \pm 0,0933	138,396 \pm 0,1464 ^a
<i>C. penicillata</i>	3	100	71,649 \pm 0,1007	133,655 \pm 0,0845 ^b
<i>M. unguiculatus</i>	7	100	71,364 \pm 0,1078	129,96 \pm 0,1512 ^c

Médias com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre si.

7.4. Produção de rédias e metacercárias de *F. hepatica*

Na FIGURA 3, e 4 encontram-se os valores medianos e o número médio de rédias e metacercárias obtidas nos intervalos de 60 a 74 dias após a infecção de *L. columella* por miracídios originados de ovos de *F. hepatica* oriunda de bovinos antes e após a passagem do parasito em *C. penicillata*.

As comparações entre os valores medianos encontrados para o número de rédias e metacercárias de cada um dos hospedeiros em todo o período do estudo mostraram que entre estes existem diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$. A produção, tanto de rédias quanto de metacercárias de *F. hepatica* oriunda de *C. penicillata* foi inferior em relação à produção das formas evolutivas de *F. hepatica* oriunda de bovinos, durante todo o período de estudo (FIGURA 3).

Para verificar, se o comportamento das contagens de rédias e metacercárias foram influenciados pelo tipo de hospedeiro definitivo e tempo de infecção foi utilizado o modelo de Poisson. Foi observado que, tanto para rédias quanto para metacercárias de *F. hepatica* oriunda de bovinos e de *C. penicillata* os valores encontrados apresentaram comportamento semelhante ao longo do tempo (FIGURA 4).

O número médio de metacercárias de *F. hepatica* oriunda de bovinos apresentou picos na produção aos 63 e 68 dias em relação ao número médio de metacercárias de *F. hepatica* oriunda de *C. penicillata* que apresentou picos aos 64 e 66 dias após a infecção. O número médio de rédias de *F. hepatica* oriunda de bovinos apresentou picos, aos 60 e 68 dias em relação ao número

médio de rédias de *F. hepatica* oriunda de *C. penicillata* que apresentou picos aos 66 e 70 dias após a infecção (FIGURA 4).

Não foram obtidos dados da produção de formas evolutivas originadas do parasito na infecção de *M. unguiculatus* devido ao baixo número de ovos eliminados nas fezes e ao fato de que quando incubados estes não formaram miracídio.

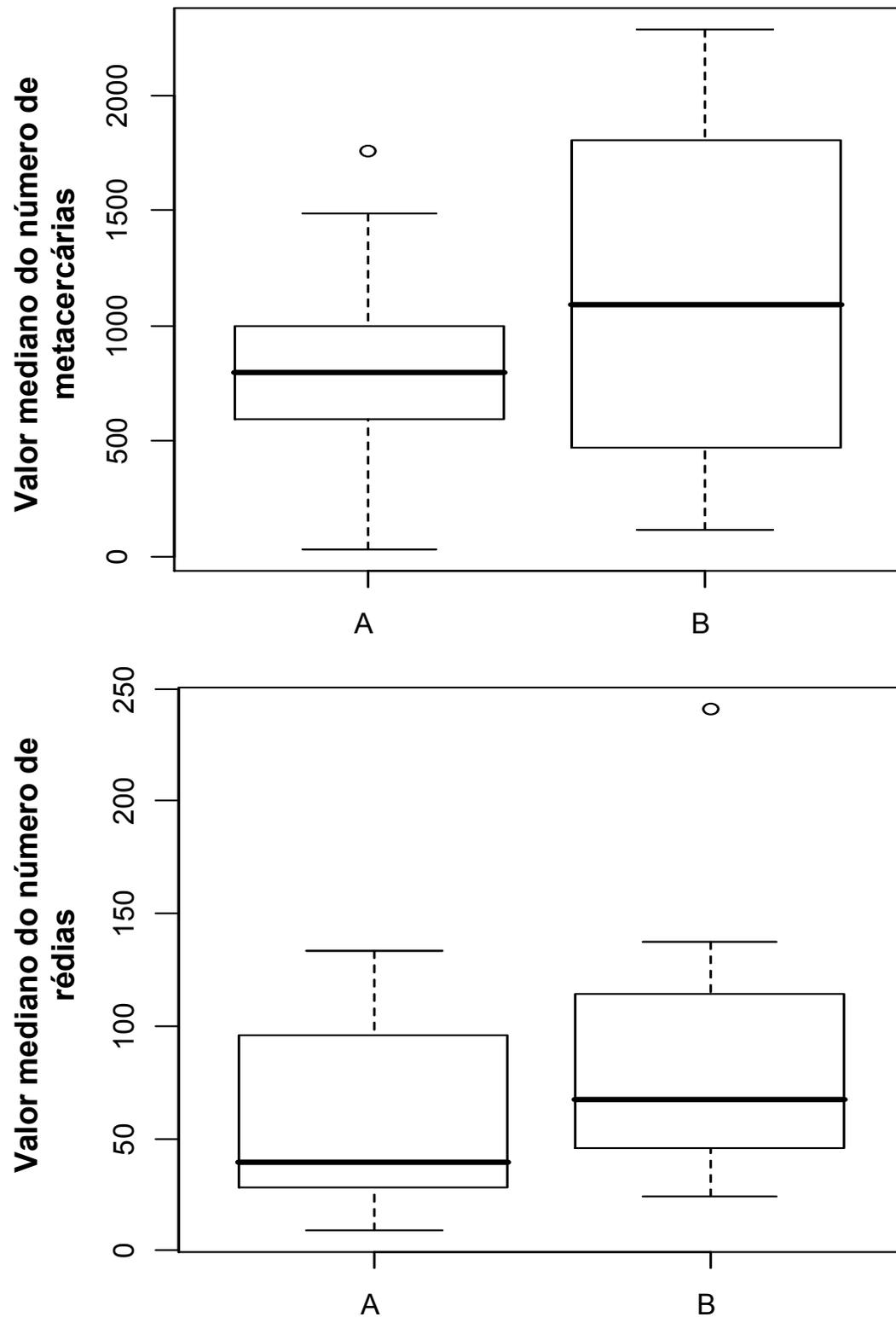


FIGURA 3- Valores medianos do número de metacercárias e rédias de *Fasciola hepatica* de bovinos naturalmente infectados (B) e após a passagem em *Callithrix penicillata* (A), durante todo o período de estudo.

° Outline

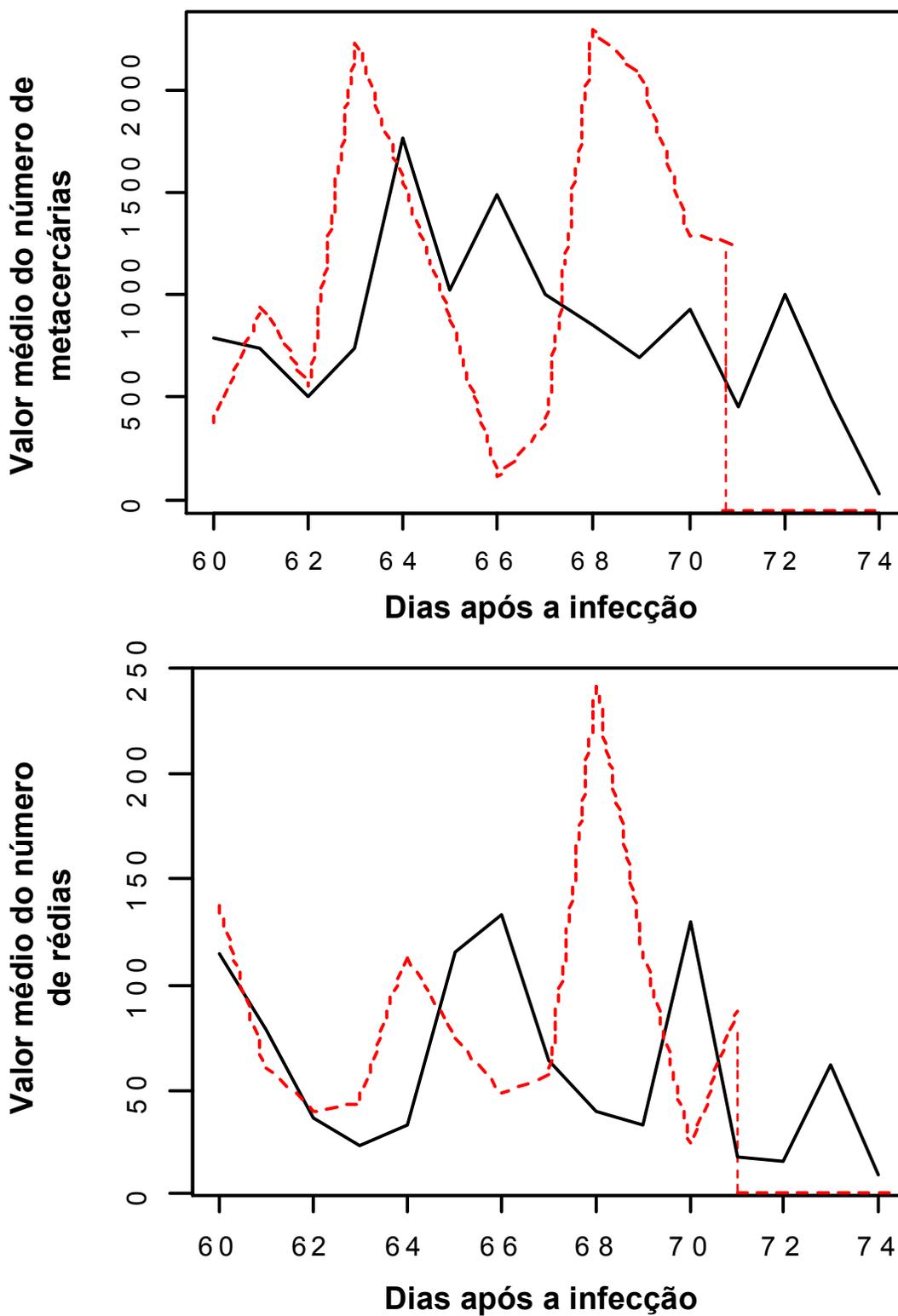


FIGURA 4- Valores médios do número de rédias e metacercárias de *Fasciola hepatica* de bovinos (---) e *Callithrix penicillata* (—) recuperadas de *Lymnaea columella*, ao longo do período de estudo.

7.5. Alterações patológicas macroscópicas observadas em *M. unguiculatus* infectados por diferentes números de metacercárias de *F. hepatica*

Na TABELA 3, 4 e 5 estão relacionadas as percentagens de animais que apresentaram lesões, os órgãos onde foram encontrados alterações macroscópicas e o número de parasitos e ovos recuperados no período do 10° ao 100° DPI com intervalos de dez dias quando foram realizadas necropsias de cada um dos animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc.

No intestino delgado foram observados: edema da mucosa caracterizado por coloração brilhante, aumento de volume e acúmulo de líquido; nódulos esbranquiçados com halo de hemorragia e pontos de hemorragia na serosa

As alterações do fígado foram caracterizadas por: órgão apresentando superfície irregular ou lisa; coloração amarelada ou avermelhada, bordas abauladas; consistência friável; presença de nódulos em alguns casos de coloração amarelo brancacentos ou vermelho enegrecidos, fluído ao corte líquido amarelo esverdeado ou vermelho escuro, de consistência firme ou encapsulado; focos de necrose com coloração enegrecida, focos de fibrose e pontos hemorrágicos distribuídos difusamente pelo parênquima; dilatação da vesícula biliar às vezes fluído líquido alaranjado formando grumos e cápsula enrijecida (FIGURA 5).

Nos pulmões foram encontradas alterações caracterizadas por: coloração de vermelho escuro brilhante, consistência firme, superfície lisa e uniforme ou irregular e áreas hemorragia nas superfícies ventral e dorsal.

No baço foram observadas: áreas hemorrágicas, bordas abauladas, focos de fibrose, coloração esbranquiçada ou vermelho intenso e pontos brancos distribuídos difusamente que se aprofundavam ao corte.

Os linfonodos mesentéricos, apresentaram aumento de volume, consistência esponjosa ou firme, coloração vermelho escuro ou acinzentada e líquido amarelado fluído ao corte.

No diafragma de um animal infectado com 3Mc aos 80 DPI foram observados pontos hemorrágicos distribuídos difusamente.

Apenas o rim direito de um animal infectado com 8Mc aos 40 DPI apresentou alterações. Foram observadas extensas áreas de coloração em vermelho escuro, consistência friável e nodulações de coloração brancacentas firmemente aderidas ao tecido. Ao corte fluído líquido viscoso em discreta quantidade com ovos de *F. hepatica* também encontrados aderidos à superfície do órgão, observados em microscópio estereoscópio no aumento de 100X. Foram recuperados doze ovos de *F. hepatica* (FIGURA 6).

No pâncreas de um animal infectado com 5Mc aos 40 DPI foi observado aumento de volume e presença de pontos hemorrágicos de consistência firme localizados na parte medial, face dorsal do órgão, medindo 2x2mm.

7.5.1. Recuperação de parasitos

À necropsia foi recuperado no ducto biliar de um animal infectado com 5Mc aos 30 DPI um parasito medindo 11,20 X 5,95µm.

Em outros dois animais infectados com 5Mc e 8Mc, aos 40 e 50 DPI, foi recuperado um parasito no lavado da cavidade peritoneal de cada um dos animais, medindo 13,68 X 5,60 e 15,93 X 6,85 µm, respectivamente. Em ambos animais, também no lavado da cavidade peritoneal, foram recuperados ovos do parasito, respectivamente 56 e 18 ovos contados em microscópio estereoscópio aumento de 100X.

Dois animais do grupo G5Mc e um do grupo G3Mc, que seriam sacrificados aos 40 dias após a infecção morreram aos 34, 35 e 36 dias respectivamente.

Nos três casos o fígado apresentava superfície irregular; bordas abauladas; pontos hemorrágicos distribuídos difusamente pelo parênquima; áreas de necrose caracterizadas por tecido branco acinzentado ou coloração vermelho-enegrecida e consistência firme; fibrose caracterizada por substituição do tecido formando nódulos na superfície do órgão e vesícula biliar repleta de

bile formando precipitado. Em dois animais os pulmões apresentavam coloração esbranquiçada.

Nos animais que morreram aos 34 e 35 dias, infectados com 5Mc foi recuperado um parasito no lavado da cavidade peritoneal de cada um dos animais, medindo 11,45 X 5,25 e 11,60 X 5,20 μ m, respectivamente. No animal morto aos 36 dias não foi encontrado parasito.

Em dois animais infectados com 8Mc aos 30 e 40 DPI foram recuperados apenas ovos de *F. hepatica* no lavado da cavidade peritoneal, respectivamente, 12 e 16 ovos observados e contados em microscópio estereoscópio no aumento de 100X.

Aos 50 e 80 DPI em dois animais infectados com 3Mc foram recuperados apenas ovos do parasito. Aos 50 dias foram recuperados 62 ovos no lavado da cavidade peritoneal, observados e contados em microscópio estereoscópio aumento de 100X. Aos 80 dias os ovos foram visualizados, em microscópio estereoscópio no aumento de 100X, aglomerados na superfície e no interior dos linfonodos mesentéricos, impossibilitando a contagem dos mesmos.

Aos 100 DPI em um animal infectado com 5Mc foi recuperado apenas um ovo no lavado da cavidade peritoneal.

TABELA 3- Percentagem dos *Meriones unguiculatus* dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc, infectados experimentalmente com três, cinco e oito metacercárias de *Fasciola hepatica* oriunda de bovinos, respectivamente, após a passagem em *Callithrix penicillata*, que apresentaram lesões no período do 10° ao 100° DPI com intervalos de dez dias, quando foram realizadas necropsias.

DPI	10	20	30	34	35	36	40	50	60	70	80	90	100
Grupos													
G3Mc	*	22,2	1,8	*	*	*	16,2	16,2	1,8	*	11,2	*	*
G5Mc	*	*	11,2	1,8	1,8	1,8	16,2	1,8	1,8	*	*	11,2	1,8
G8M	1,8	11,2	11,2	*	*	*	11,2	16,2	1,8	*	*	*	*

DPI (Dias após a infecção); * (Nada observado); G3Mc (Gerbil infectado com três metacercárias); G5Mc (Gerbil infectado com cinco metacercárias); G8Mc (Gerbil infectado com oito metacercárias); * (Nada observado).

TABELA 4- Órgãos que apresentaram alterações macroscópicas encontradas nos *Meriones unguiculatus* dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc, infectados experimentalmente com três, cinco e oito metacercárias de *Fasciola hepatica* oriunda de bovinos, respectivamente, após a passagem em *Callithrix penicillata*, no período do 10° ao 100° DPI com intervalos de dez dias quando foram realizadas necropsias.

DPI	10	20	30	34	35	36	40	50	60	70	80	90	100
Grupos													
G3Mc	*	F-ID Pu-B	ID Lm	*	*	*	F-ID	F-ID Pu	F	*	F-ID Pu-B Lm-D	*	*
G5Mc	*	*	F-ID Pu-B	F Pu	F-ID Pu	F-Pu B	F-ID Pu-B Pa	Pu	F	*	*	Pu Lm	F ID
G8Mc	F Lm	F-Pu B	F B	*	*	*	F-ID Pu-R	F-ID Pu	F-ID	*	*	*	*

DPI (Dias apos a infecção); F (Fígado); ID (Intestino delgado); B (Baço); Lm (Linfonodos mesentéricos); Pu (Pulmão); Pa (Pâncreas); D (Diafragma); R (Rim); G3Mc (Gerbil infectado com três metacercárias); G5Mc (Gerbil infectado com cinco metacercárias); G8Mc (Gerbil infectado com oito metacercárias); * (Nada observado).

TABELA 5- Número de parasitos e ovos de *Fasciola hepatica* recuperados dos *Meriones unguiculatus* infectados experimentalmente com três, cinco e oito metacercárias de *Fasciola hepatica* oriunda de bovinos, respectivamente, após a passagem em *C. penicillata*, no período do 10° ao 100° DPI com intervalos de dez dias quando foram realizadas necropsias.

DPI	10	20	30	34	35	36	40	50	60	70	80	90	100
Grupos													
G3Mc	*	*	*	*	*	*	*	62Ovos	*	*	Ovos [□]	*	*
G5Mc	*	*	1PR	1PR	1PR	*	1PR 56Ovos	*	*	*	*	*	1Ovo
G8Mc	*	*	12Ovos	*	*	*	16Ovos	1PR 180vos	*	*	*	*	*

DPI (Dias apos a infecção); PR-(Número de Parasitos recuperados); * (Nada observado); Ovos [□] (Ovos não contados); G3Mc (Gerbil infectado com três metacercárias); G5Mc (Gerbil infectado com cinco metacercárias); G8Mc (Gerbil infectado com oito metacercárias).

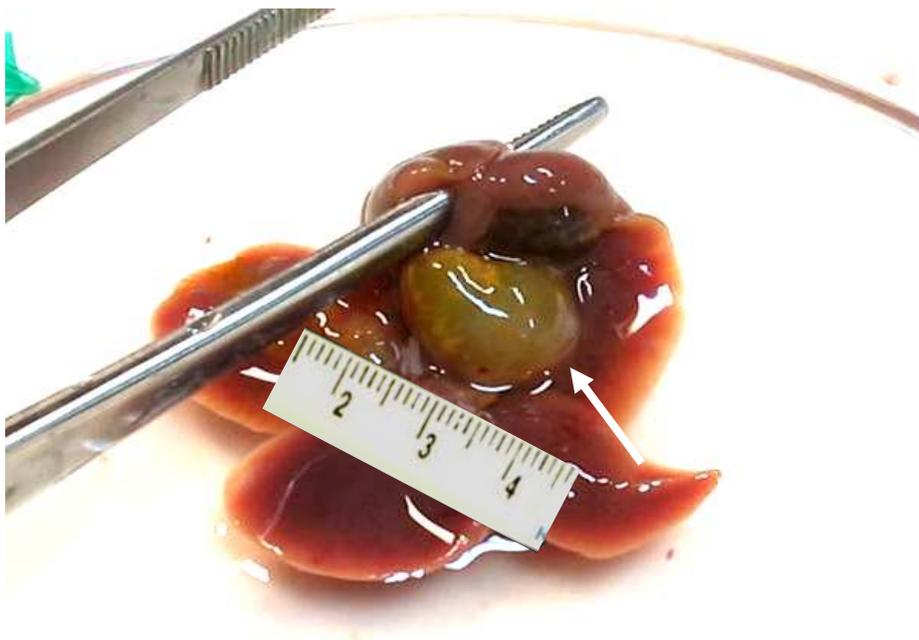


FIGURA 5- Fígado de um gerbil infectado com oito metacercárias, aos 20 DPI, com dilatação da vesícula biliar (seta).



FIGURA 6- Rim direito de um gerbil infectado com cinco metacercárias, aos 40 DPI, apresentando aumento de volume, superfície irregular, áreas de hemorragia e focos necrose (setas).

7.6. Alterações patológicas microscópicas observadas em *M. unguiculatus* infectados por diferentes números de metacercárias de *F. hepatica*

No fígado de um gerbil infectado com 3Mc os 20 DPI foram visualizadas no parênquima hepático áreas com hemorragias caracterizadas por espaços formando túneis preenchidos por hemácias íntegras (áreas em tons avermelhadas) e hemácias já destruídas (áreas em tons de vermelho-claro) e por proteínas do parasito (áreas em tons de rosa e acinzentadas). Margeando estes espaços foi observado um discreto infiltrado inflamatório constituído de polimorfonucleares caracterizando a ocorrência de áreas de necrose (Figura 7A). Foram observadas alterações em um espaço porta, caracterizadas por dilatação do ducto biliar, dilatação em um ramo da artéria hepática e rompimento da veia porta com hemorragia (Figura 7B).

Além da presença de áreas hemorrágicas recentes, caracterizadas por hemácias em tons avermelhados e tons em vermelho-claro, o exame microscópico do fígado de um gerbil infectado com 3Mc aos 80 DPI apresentou áreas hemorrágicas mais antigas e infiltrado inflamatório indicando a presença de áreas de necrose no parênquima hepático. As áreas com hemorragias antigas foram identificadas por espaços de coloração em castanho-escuro, preenchidos por deposição de hemossiderina, pigmento derivado do metabolismo de hemoglobina (Figura 8A e B).

A avaliação microscópica do fígado de um gerbil infectado com 5Mc aos 30 DPI mostrou ao redor de áreas de hemorragia e deposição de proteínas do

parasito uma reação inflamatória caracterizada pela presença de polimorfonucleares e predomínio de mononucleares (Figura 9A e B).

No baço de um gerbil infectado com 3Mc aos 20 DPI foram visualizados vários espaços vazios formando túneis preenchidos por hemácias íntegras e algumas já destruídas (áreas em vermelho mais escuro e vermelho mais claro) caracterizando a presença de diversas áreas com hemorragia, infiltrado inflamatório e surgimento de vários focos de necrose. Foi observada destruição da cápsula do parênquima, ocasionada pelo rompimento de um folículo e áreas de necrose, com discreto infiltrado inflamatório ao redor. Foram observadas áreas de fibrose indicadas por deposição de fibrina no tecido (Figura 10A e B).

No parênquima pulmonar de um gerbil infectado com 5Mc aos 30 DPI foram visualizadas áreas com hemorragia antiga, também de coloração castanho-escuro, caracterizada pela deposição de hemossiderina no interior de macrófagos.

No rim direito de um gerbil infectado com 5Mc aos 40 DPI foram visualizados vários espaços formando túneis preenchidos por secreções do parasito e hemácias destruídas e íntegras originando o aparecimento de vários focos hemorrágicos e intensa reação inflamatória formada por polimorfonucleares e mononucleares. No parênquima do órgão foram observados vários ovos de *F. hepatica* margeados por infiltrado inflamatório formado por polimorfonucleares e mononucleares (Figura 11A, B e C).

No diafragma de um gerbil infectado com 3Mc aos 80 DPI, foram encontrados ovos de *F. hepatica* no tecido conjuntivo formando uma discreta

reação fibrótica ao redor caracterizada pela presença de escassos macrófagos (Figura 12).

Nos linfonodos mesentéricos do mesmo animal foi observada uma intensa reação macrofagocitária de cunho hemorrágico devido à intensa desintegração de eritrócitos. A análise microscópica mostrou extensas áreas com deposição de hemossiderina, ocasionadas pelo metabolismo da hemoglobina, visualizada através da reação do Azul da Prússia, dentro de macrófagos fortemente corados em azul-escuro. Foram observados vários ovos de *F. hepatica* aderidos ao tecido (Figura 13A e B).

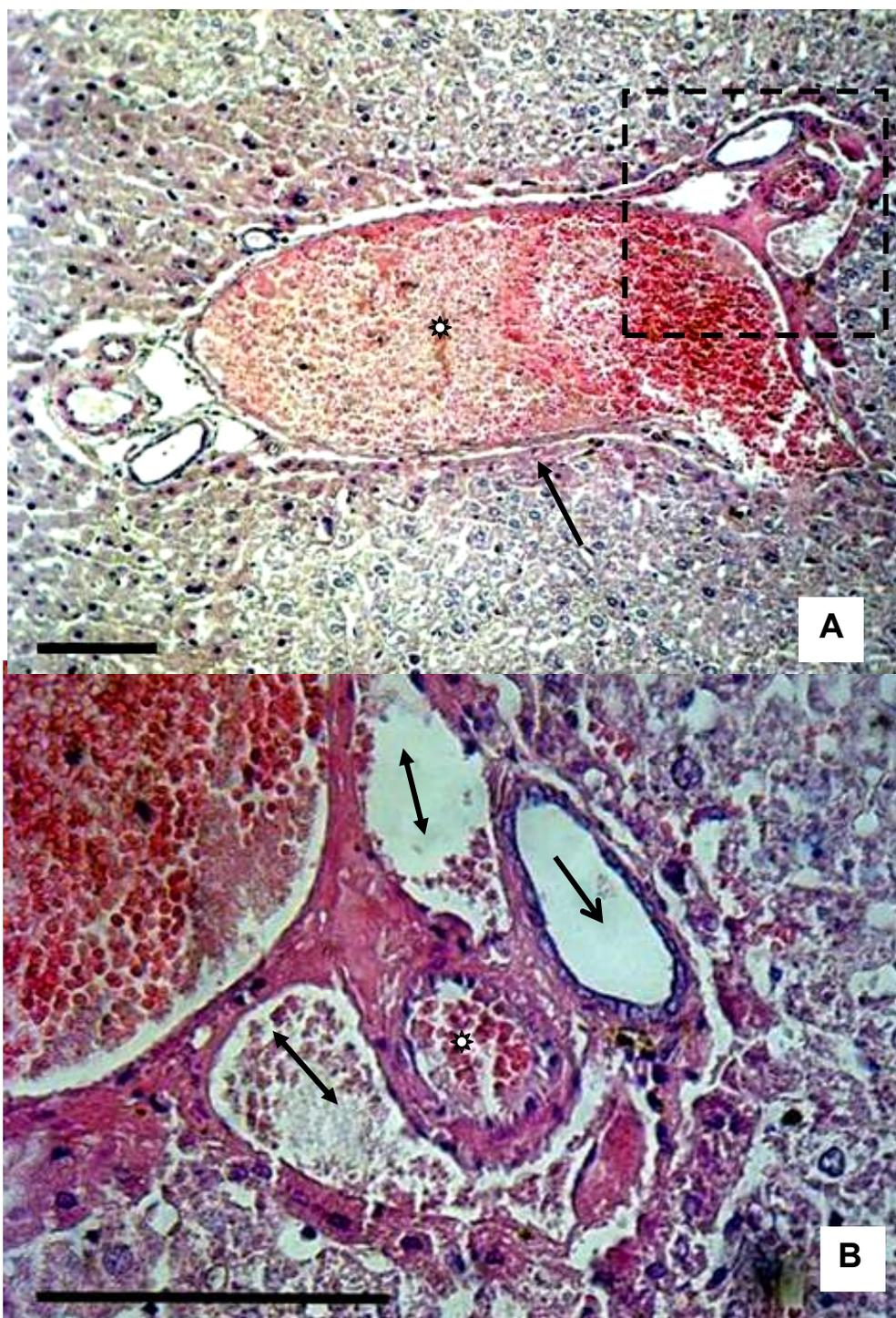


FIGURA 7A- Fotomicrografia do fígado de um gerbil infectado com 3Mc, aos 20 DPI, mostrando extensa área de hemorragia (asterisco) e discreto infiltrado inflamatório com polimorfonucleares ao redor (seta). FIGURA 7B- Fotomicrografia do detalhe anterior mostrando alterações no espaço porta; dilatação do ducto biliar (seta em flecha), dilatação em ramo da artéria hepática (asterisco) e rompimento da veia porta com hemorragia (seta de duas cabeças). HE. Escala 100 μ m.

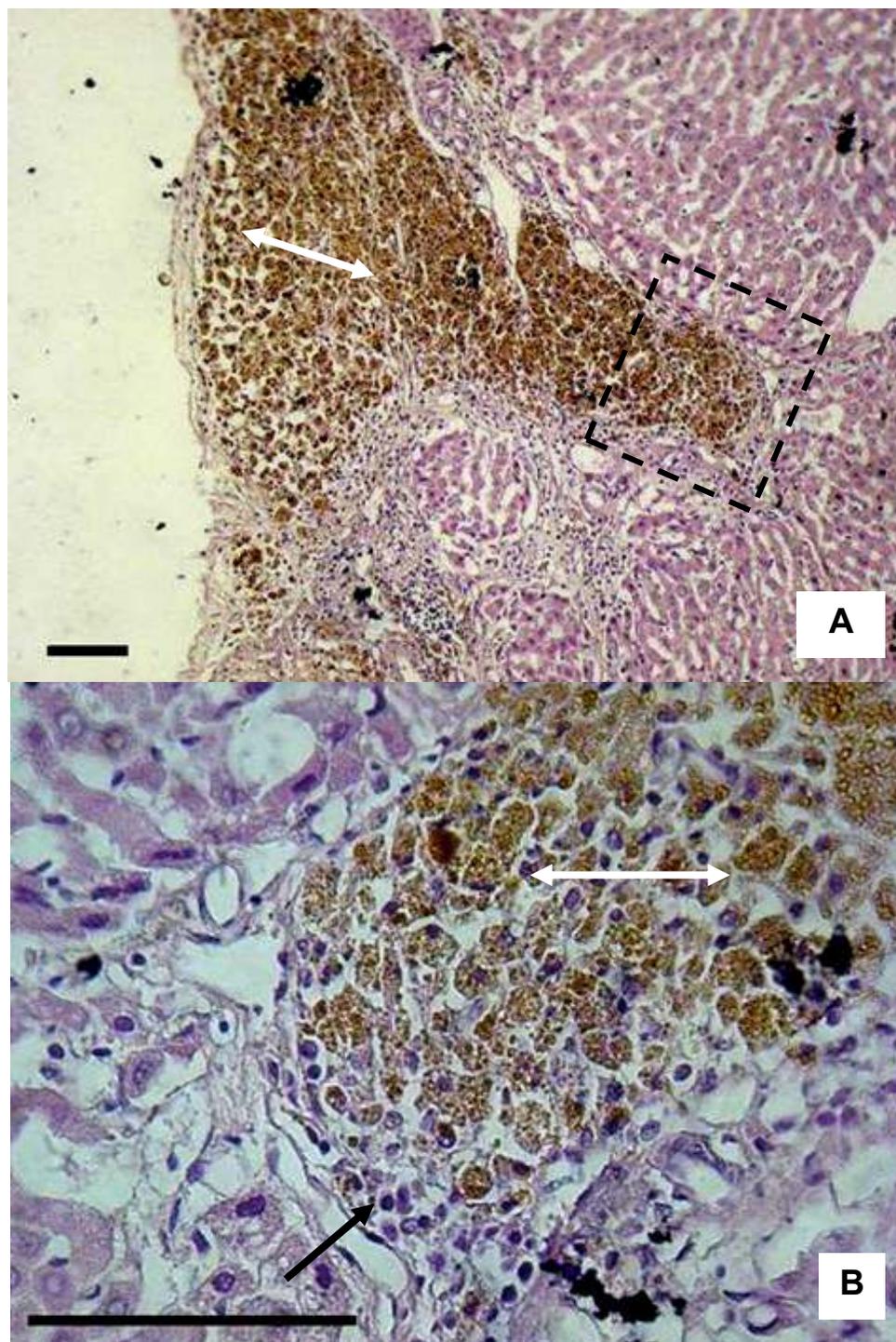


FIGURA 8A- Fotomicrografia do fígado de um gerbil infectado com 3Mc, aos 80 DPI, mostrando área de hemorragia antiga de coloração castanho-escuro, com deposição de hemossiderina (seta de duas cabeças). FIGURA 8B- Fotomicrografia do detalhe anterior mostrando infiltrado inflamatório (seta) ao redor da área de hemorragia antiga. HE. Escala 100µm.

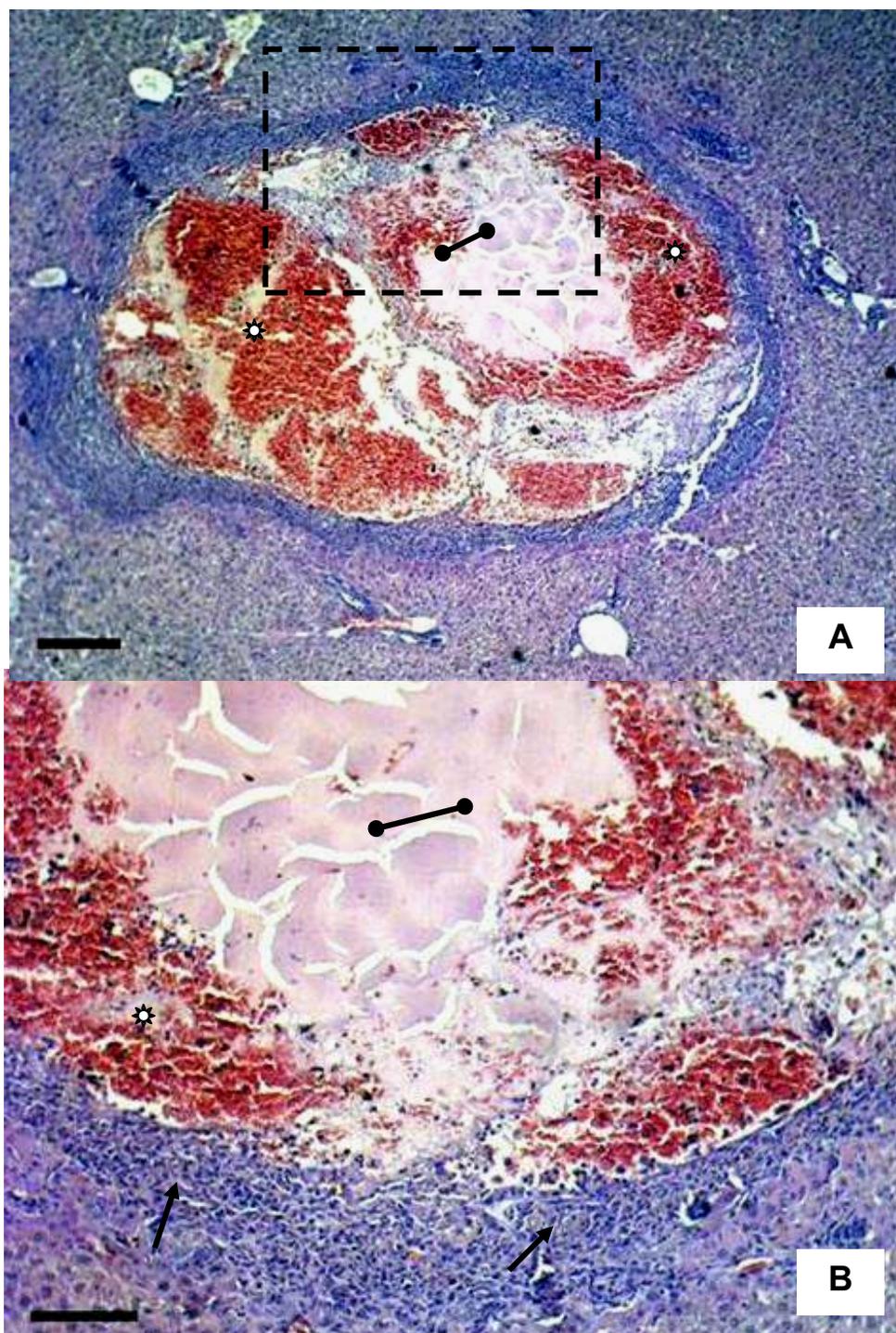


FIGURA 9A- Fotomicrografia do fígado de um gerbil infectado com 5Mc, aos 30 DPI, mostrando extensa área de hemorragia (asterisco) e área de deposição de proteínas do parasito (seta de pontas redondas). FIGURA 9B- Fotomicrografia do detalhe anterior mostrando infiltrado inflamatório formado por polimorfonucleares e predomínio de mononucleares (setas) ao redor das áreas de hemorragia (asteriscos) e deposição de proteínas do parasito (seta de pontas redondas). HE. Escala 100µm.

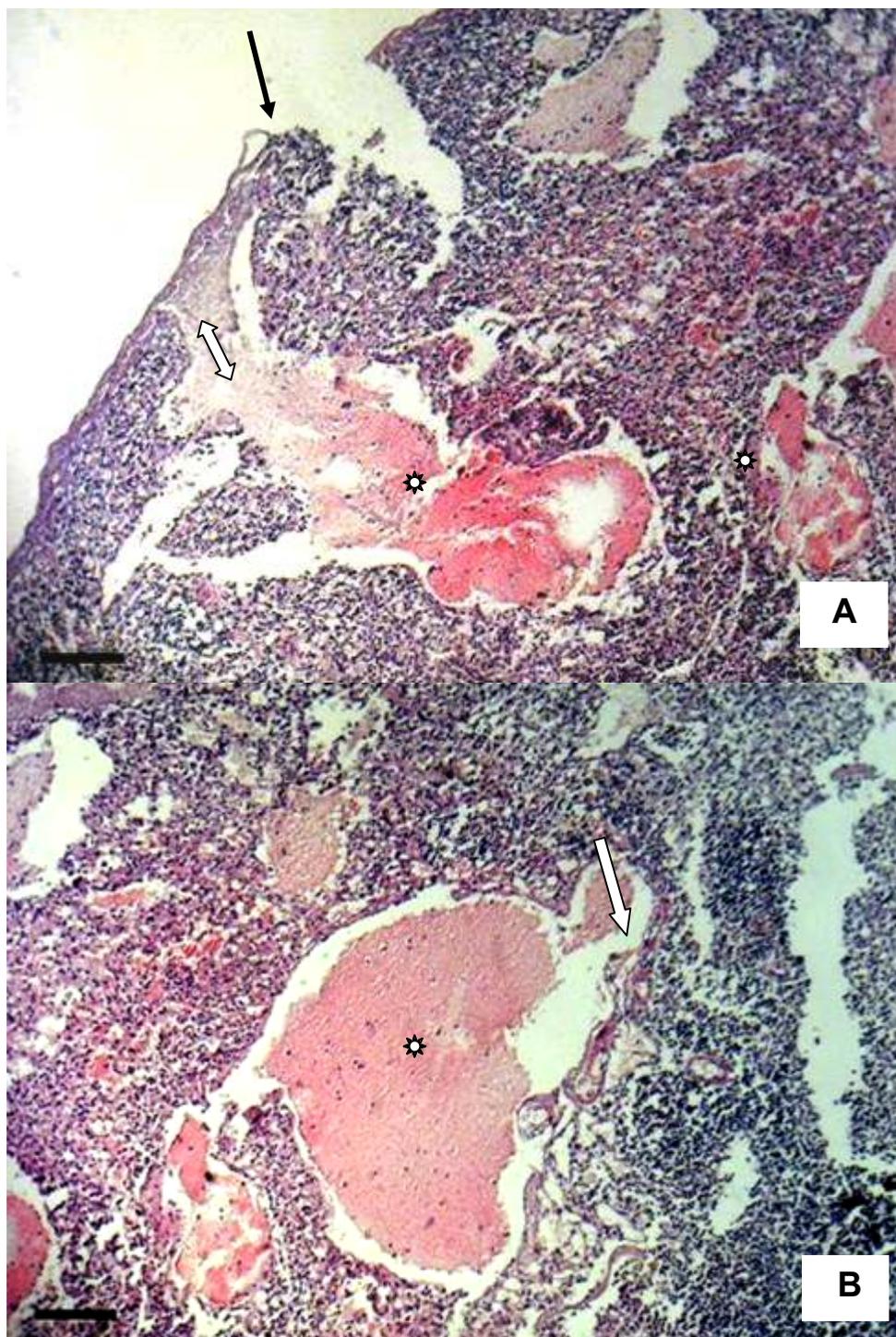


FIGURA 10A- Fotomicrografia do baço de um gerbil infectado com 3Mc, aos 20 DPI, mostrando o rompimento de um folículo (seta); áreas de hemorragia (asteriscos) e de necrose (seta larga). FIGURA 10B- Fotomicrografia mostrando extensa área de hemorragia (asterisco) e deposição de fibrina ao redor (seta larga de uma cabeça). HE. Escala 100 μ m.

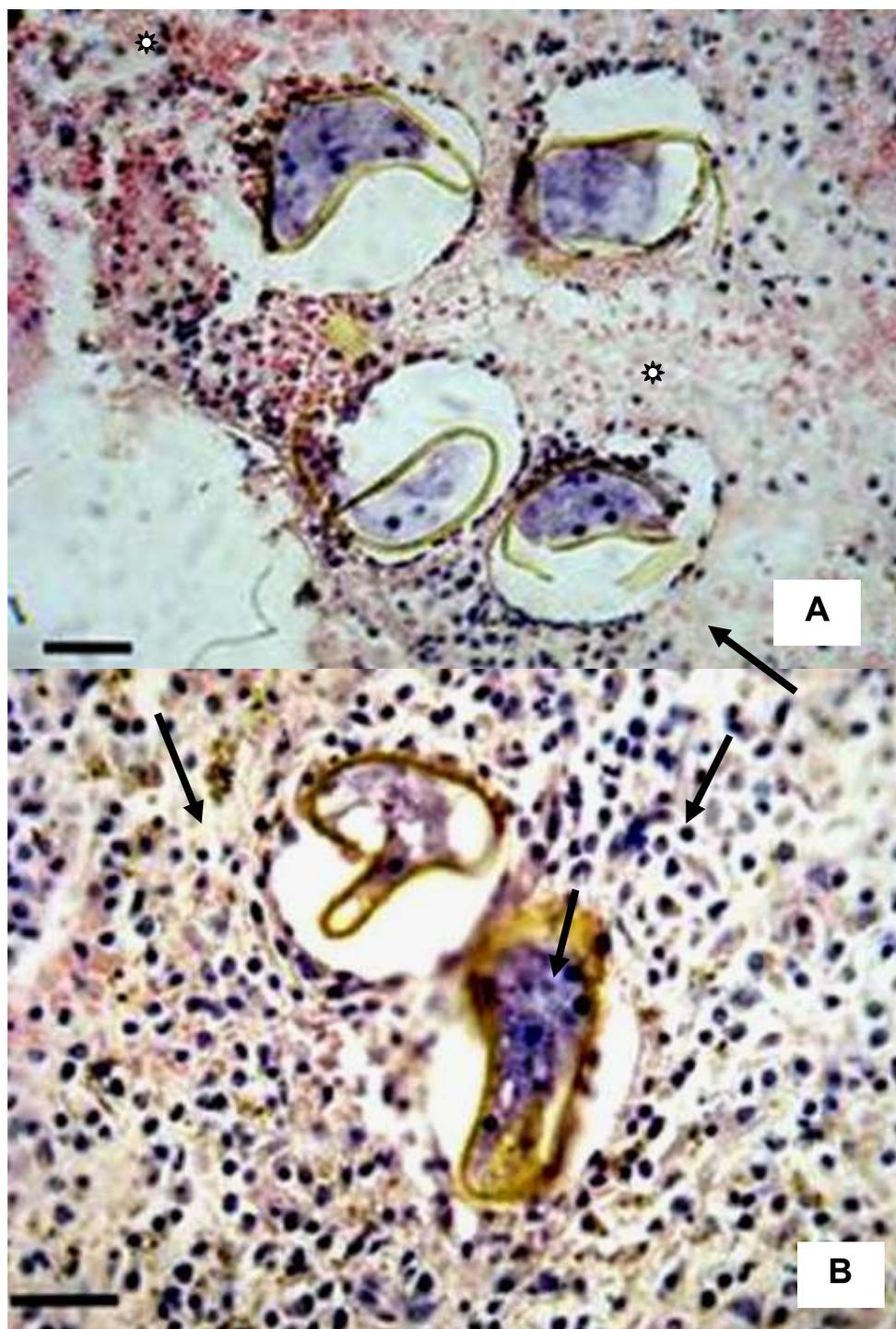


FIGURA 11A- Fotomicrografia do rim direito do gerbil infectado com 5Mc, aos 40DPI, mostrando quatro ovos de *Fasciola hepatica* com infiltrado inflamatório constituído predominantemente por polimorfonucleares (setas) e áreas de hemorragia no parênquima (asteriscos). FIGURA 11B- Fotomicrografia do rim direito mostrando intenso infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares, no parênquima do órgão e ao redor de dois ovos de *Fasciola hepatica* (setas). HE. Escala 30µm.

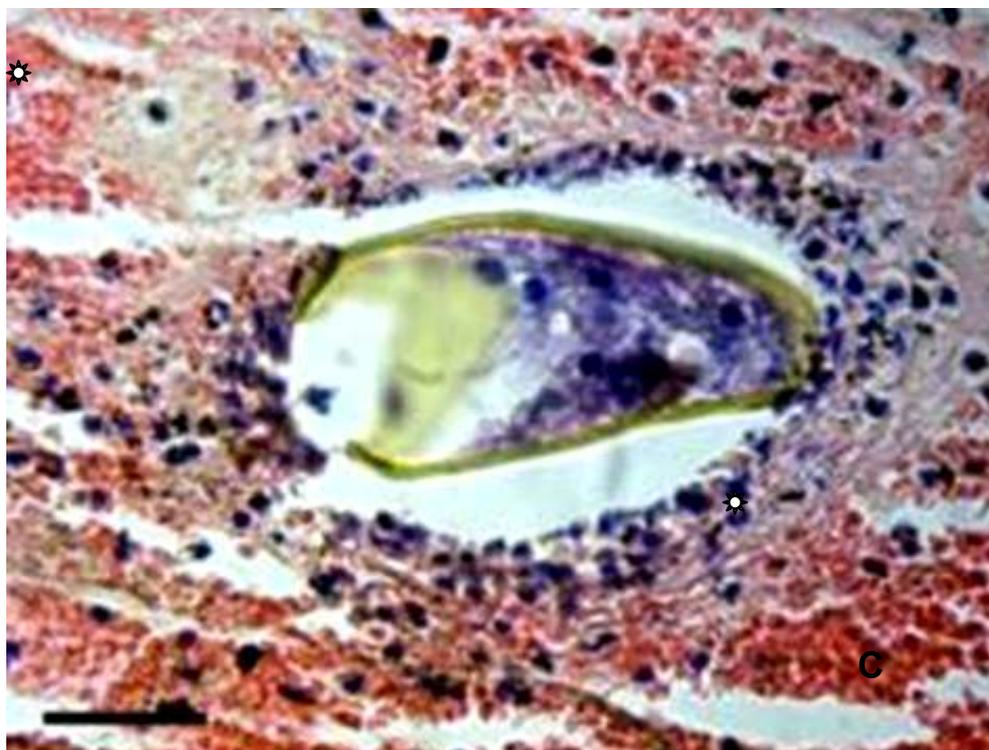


FIGURA 11C- Fotomicrografia do rim direito do gerbil infectado com 5Mc, aos 40 DPI, mostrando um ovo de *Fasciola hepatica* com infiltrado inflamatório ao redor formado por polimorfonucleares e áreas de hemorragia no parênquima do órgão (asteriscos). HE. Escala 30 μ m.

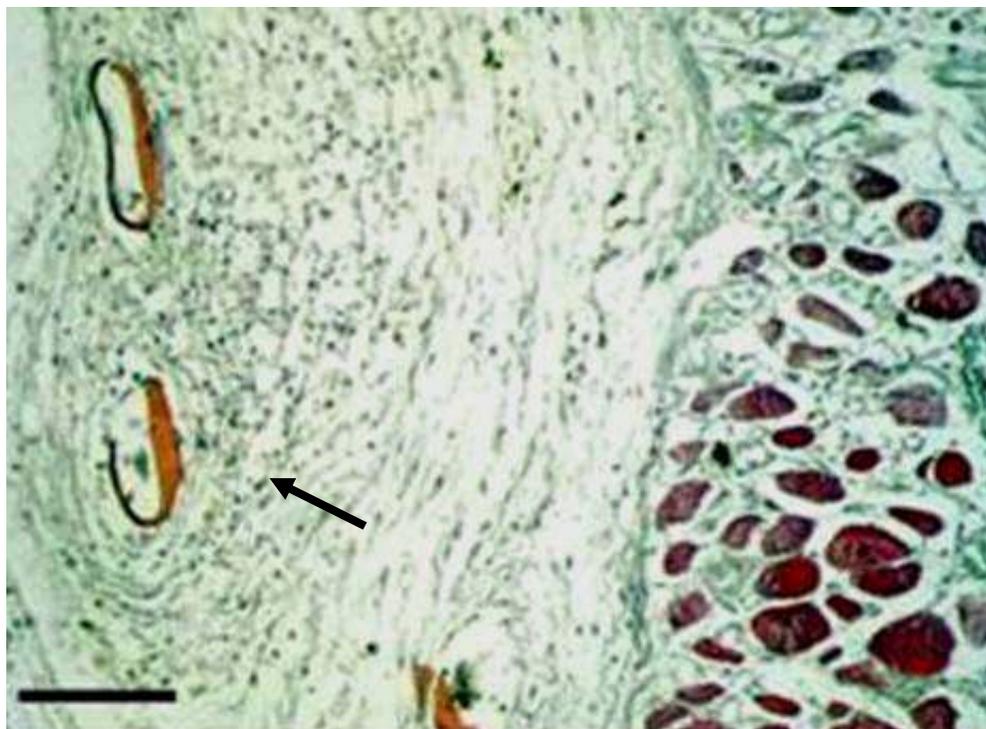


FIGURA 12- Fotomicrografia do diafragma de um gerbil infectado com 3Mc, aos 80 DPI, mostrando ovos de *Fasciola hepatica* aderidos ao tecido conjuntivo e escassos macrófagos formando discreta reação fibrótica (seta). Tricrômico de Gomory. Escala 100 μ m.

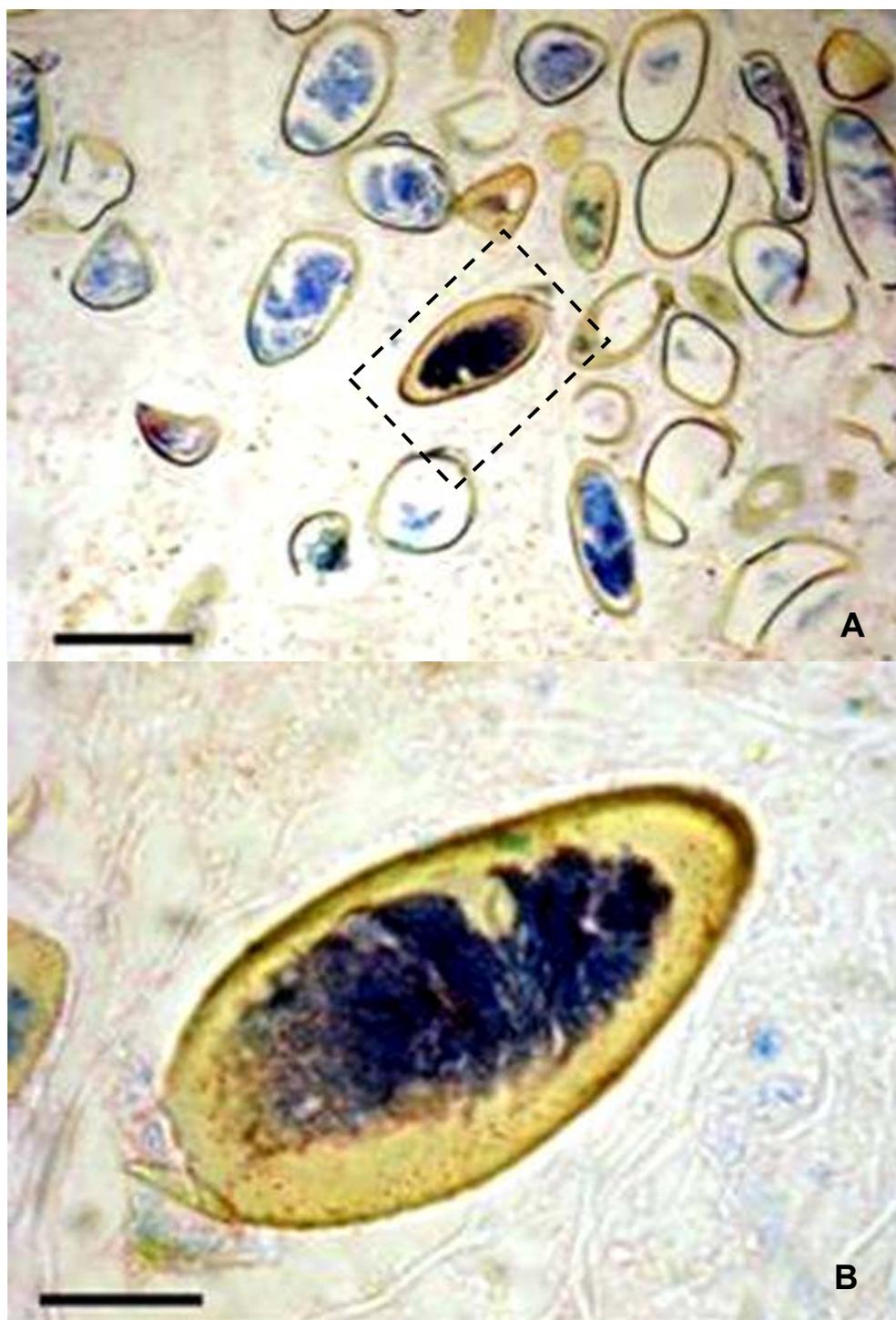


FIGURA 13A- Fotomicrografia dos linfonodos mesentéricos de um gerbil infectado com 3Mc, aos 80 DPI, mostrando vários ovos de *Fasciola hepatica* aderidos ao tecido. Escala 100 μ m. FIGURA 13B- Fotomicrografia do detalhe anterior mostrando um ovo de *Fasciola hepatica*. Azul da Prússia. Escala 30 μ m.

7.7. Perfil hematológico na infecção de *M. unguiculatus* infectados por diferentes números de metacercárias de *F. hepatica*

7.7.1 Hematócrito

Na FIGURA 14 encontram-se os valores médios do hematócrito dos grupos de *M. unguiculatus* infectados experimentalmente com metacercárias de *F. hepatica*.

O valor médio do hematócrito dos animais do grupo GSI (Controle) foi de 45%, variando entre 43 a 49%. Os animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc apresentaram valores médios inferiores aos animais do grupo GSI em todos os intervalos observados.

Ocorreram diferenças significativas, $p \leq 0,05$, entre os animais do grupo GSI e dos grupos, G3Mc aos 10, 50, 60 e 70 dias; G5Mc aos 10 e 60 dias e G8Mc aos 10 e 50 dias após a infecção.

Nas interações entre os grupos de *M. unguiculatus* infectados os animais do grupo G3Mc apresentaram valores médios inferiores aos dos grupos G5Mc e G8Mc na maioria dos intervalos exceto aos 10 e 60 dias após a infecção. Foram observadas diferenças significativas, $p \leq 0,01$, nestes intervalos e aos 40, 70, 80 e 90 dias após a infecção em relação aos animais dos grupos G5Mc e G8Mc.

Os valores médios do hematócrito dos animais dos grupos G5Mc e G8Mc mostraram-se semelhantes em quase todos os intervalos. Ocorreram

diferenças significativas entre os grupos, $p < 0,05$, aos 10 e 60 e 50 dias após a infecção, quando os valores médios dos animais do grupo G5Mc foram respectivamente inferiores e superior aos valores médios dos animais do grupo G8Mc.

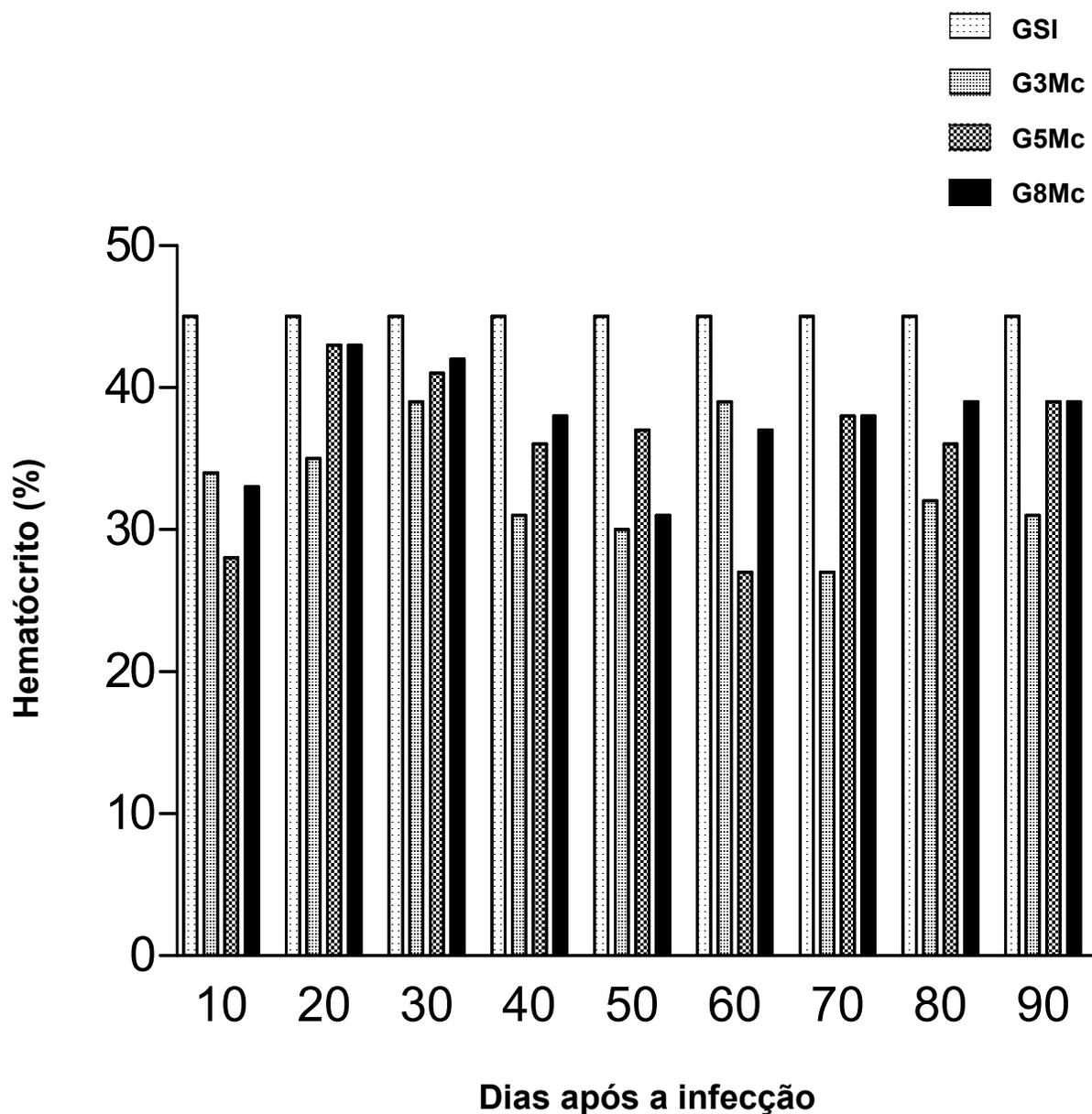


FIGURA 14 – Valores médios do hematócrito dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.

7.7.2. Contagem global de leucócitos

Os valores médios do número de leucócitos sanguíneos dos animais infectados e animais do grupo controle estão representados na FIGURA 15.

Os valores obtidos para os animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc foram superiores aos valores encontrados para o grupo GSI (Controle) na maioria dos intervalos observados. Não foram observadas diferenças significativas, $p > 0,05$, entre os animais dos grupos GSI e G3Mc aos 30 e 40 dias; G5Mc aos 50 e 60 dias e G8Mc aos 90 dias após a infecção.

Os animais do grupo G3Mc apresentaram valores médios superiores aos 50, 60 e 70 dias após a infecção em relação aos animais do grupo G5Mc e aos 80 e 90 dias em relação aos animais do grupo G8Mc. Nos outros intervalos os valores médios dos animais do grupo G3Mc foram significativamente inferiores. Ocorreram diferenças significativas, $p \leq 0,05$, aos 10, 20, 30, 40, 80 e 90 dias em relação aos animais do grupo G5Mc. Em relação aos animais do grupo G8Mc foram observados valores significativamente inferiores na maioria dos intervalos, $p \leq 0,01$.

Os animais do grupo G5Mc apresentaram valores superiores aos animais dos grupos G3Mc e G8Mc com diferenças significativas, $p \leq 0,05$, aos 20, 30, 80 e 90 dias após a infecção.

Os animais do grupo G8Mc apresentaram valores médios significativamente superiores aos 10, 40, 50, 60 e 70 dias após a infecção, com

picos aos 10 e 40 dias. Ocorreram diferenças significativas, $p \leq 0,001$, em relação aos animais dos grupos G3Mc e G5Mc.

7.7.3. Contagem diferencial

7.7.3.1. Neutrófilos bastonetes

Durante o período experimental não foram encontrados células neutrófilos bastonetes no sangue periférico dos animais do grupo GSI.

Nas interações entre os animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc ocorreram diferenças significativas, $p \leq 0,001$, aos 30, 40 e 50 dias após a infecção. Os animais dos grupos G5Mc e G8Mc apresentaram valores médios significativamente superiores aos 30 e 50 dias após a infecção, respectivamente (FIGURA 16).

7.7.3.2. Neutrófilos segmentados

Os animais do grupo GSI apresentaram valores médios no número de neutrófilos segmentados significativamente inferiores em relação aos encontrados para os animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc. Foram observadas diferenças significativas, $p \leq 0,001$, entre estes em todos os intervalos experimentais (FIGURA 17).

Os animais do grupo G3Mc apresentaram valores médios, superiores aos 50 e 70 dias em relação aos animais dos grupos G5Mc e G8Mc. Aos 70 dias foi observado um pico no número médio de neutrófilos.

Nos animais do grupo G5Mc foram observados valores médios superiores em relação aos animais dos grupos G3Mc e G8Mc aos 20 e 90 dias ocorrendo neste último intervalo um pico no número médio de neutrófilos segmentados.

Os animais do grupo G8Mc apresentaram valores médios, superiores em relação aos dos grupos G3Mc e G5Mc aos 10, 30, 40, e 60 dias. Ocorreram picos no número médio de neutrófilos segmentados aos 10 e 40 dias após a infecção.

Nas interações entre os animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc foram observadas diferenças significativas, $p \leq 0,001$, na maioria dos intervalos, exceto aos 50 dias entre os dos grupos G5Mc e G8Mc e aos 80 dias entre os dos grupos G3Mc e G8Mc.

7.7.3.3. Basófilos

Não foram observadas células basófilos no sangue periférico dos animais dos grupos GSI e G3Mc durante o período experimental.

Os animais dos grupos G5Mc e G8Mc apresentaram células basófilos aos 10, 20 e 30 dias após a infecção. Os animais do grupo G8Mc apresentaram

valores médios, superiores aos do grupo G5Mc nos três intervalos. No entanto, não ocorreram diferenças significativas, $p > 0,05$, entre estes (FIGURA 18).

7.7.3.4. Linfócitos

O valor médio do número de linfócitos encontrados em cada um dos grupos de animais infectados e grupo controle durante os intervalos de estudo estão representados na FIGURA 19.

Os animais do grupo GSI não apresentaram diferenças significativas, $p > 0,05$, em relação aos animais dos grupos G5Mc aos 60 dias e G8Mc aos 10 e 80 dias após a infecção. Em relação aos animais do grupo G3Mc foram observadas diferenças significativas em cada um dos intervalos, $p \leq 0,001$.

Aos 50 dias após a infecção os animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc apresentaram valores significativamente inferiores em relação aos animais do grupo controle e nas interações entre si, $p \leq 0,001$.

Os animais do grupo G3Mc apresentaram aos 20 e 90 dias após a infecção número médio de linfócitos significativamente maior em relação aos encontrados para os dos grupos G5Mc e G8Mc, observando-se um pico, com diferenças significativas entre estes, $p \leq 0,001$.

Os animais do grupo G5Mc apresentaram valor médio superior aos 80 dias após a infecção, observando-se um pico, com diferenças significativas em relação aos animais dos outros dois grupos de animais infectados, $p \leq 0,001$.

Os animais do grupo G8Mc apresentaram valores médios superiores em relação aos dos grupos G3Mc e G5Mc aos 40, 50 e 70 dias após a infecção, ocorrendo diferenças significativas, $p \leq 0,001$.

7.7.3.5. Monócitos

Na FIGURA 20 estão representados os valores médios do número de células monócitos dos animais dos grupos GSI e animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc. Os animais do grupo controle apresentaram valores médios significativamente superiores aos 80 e 90 dias e inferiores aos 10 e 30 dias após a infecção, em relação aos animais dos grupos G3Mc, G5Mc e G8Mc. Ocorrendo diferenças significativas entre estes, $p \leq 0,001$.

Os animais do grupo G3Mc apresentaram monócitos no sangue periférico nos intervalos de 10 a 60 dias após a infecção, ocorrendo aos 10 dias um pico com diferença significativa, $p \leq 0,05$, em relação a GSI e G8Mc.

Os animais do grupo G5Mc apresentaram picos no número médio de monócitos aos 10 dias, ocorrendo diferenças significativas em relação aos animais dos outros grupos, $p \leq 0,001$.

Os animais do grupo G8Mc apresentaram valores médios significativamente superiores, $p \leq 0,001$, aos dos animais dos grupos G3Mc, G5Mc e GSI, ocorrendo picos aos 20, 30 e 40 dias após a infecção.

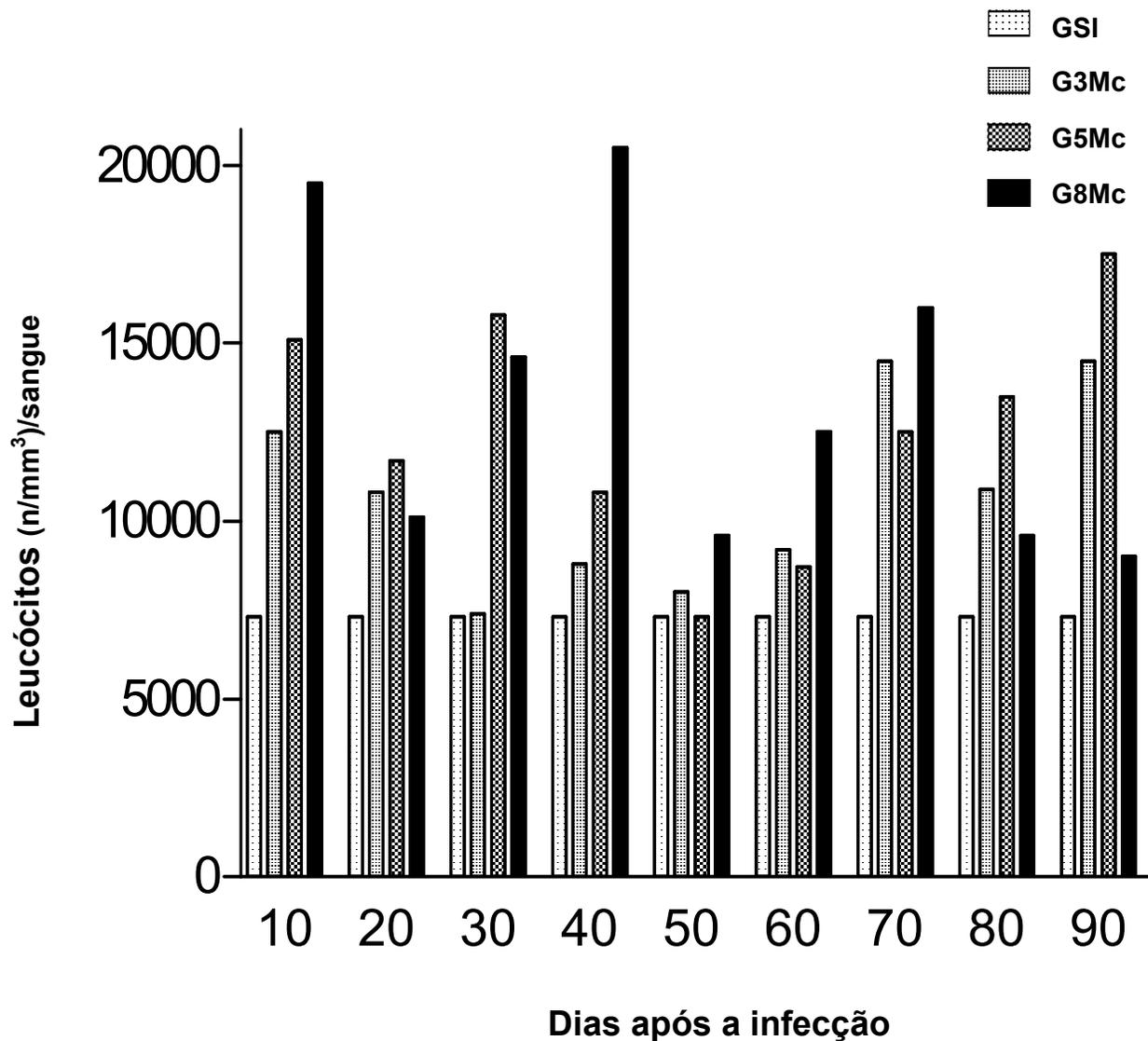


FIGURA 15 – Valores médios do número de leucócitos dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.

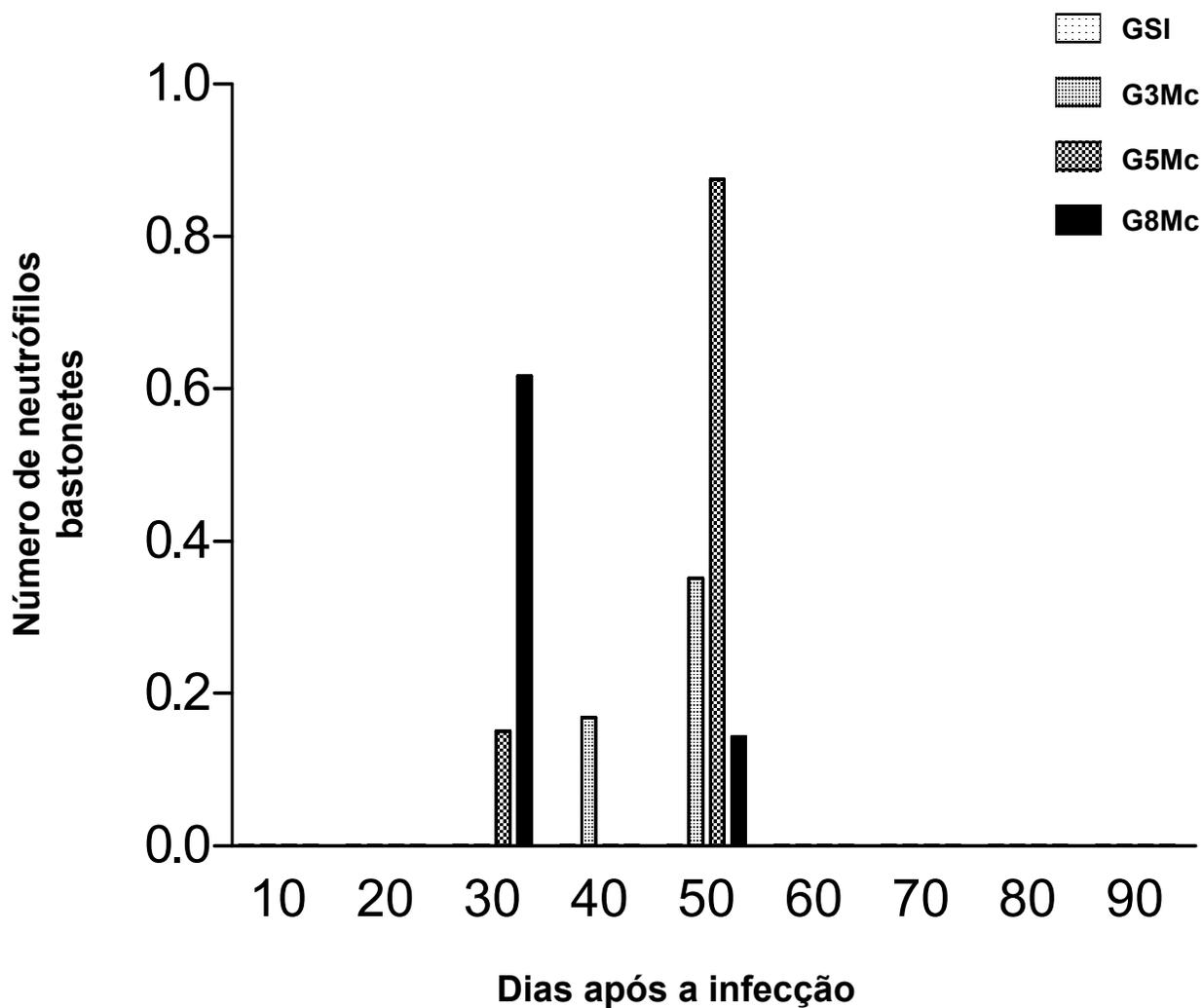


FIGURA 16 – Valores médios do número de neutrófilos bastonetes dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.

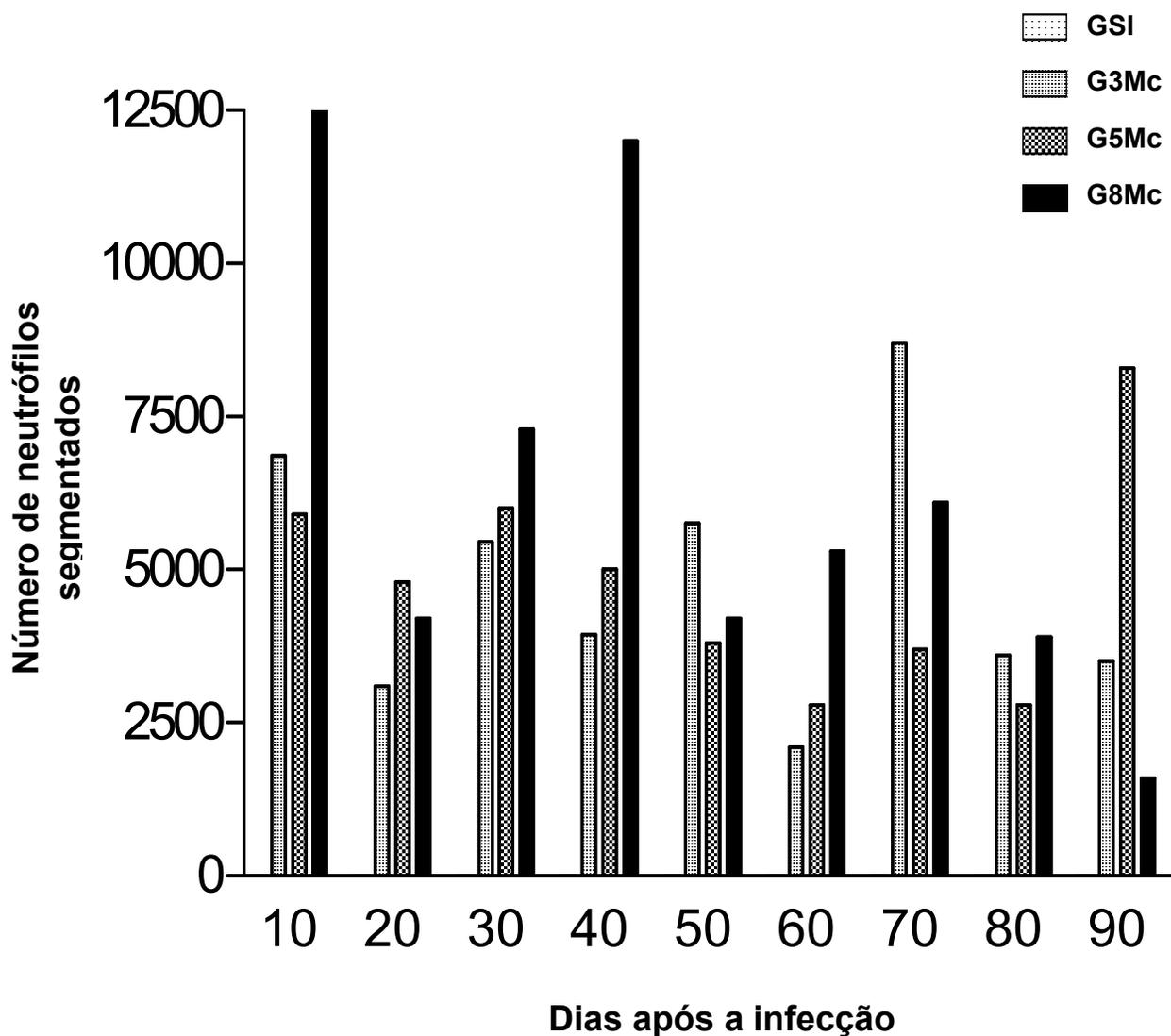


FIGURA 17 – Valores médios do número de neutrófilos segmentados dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.

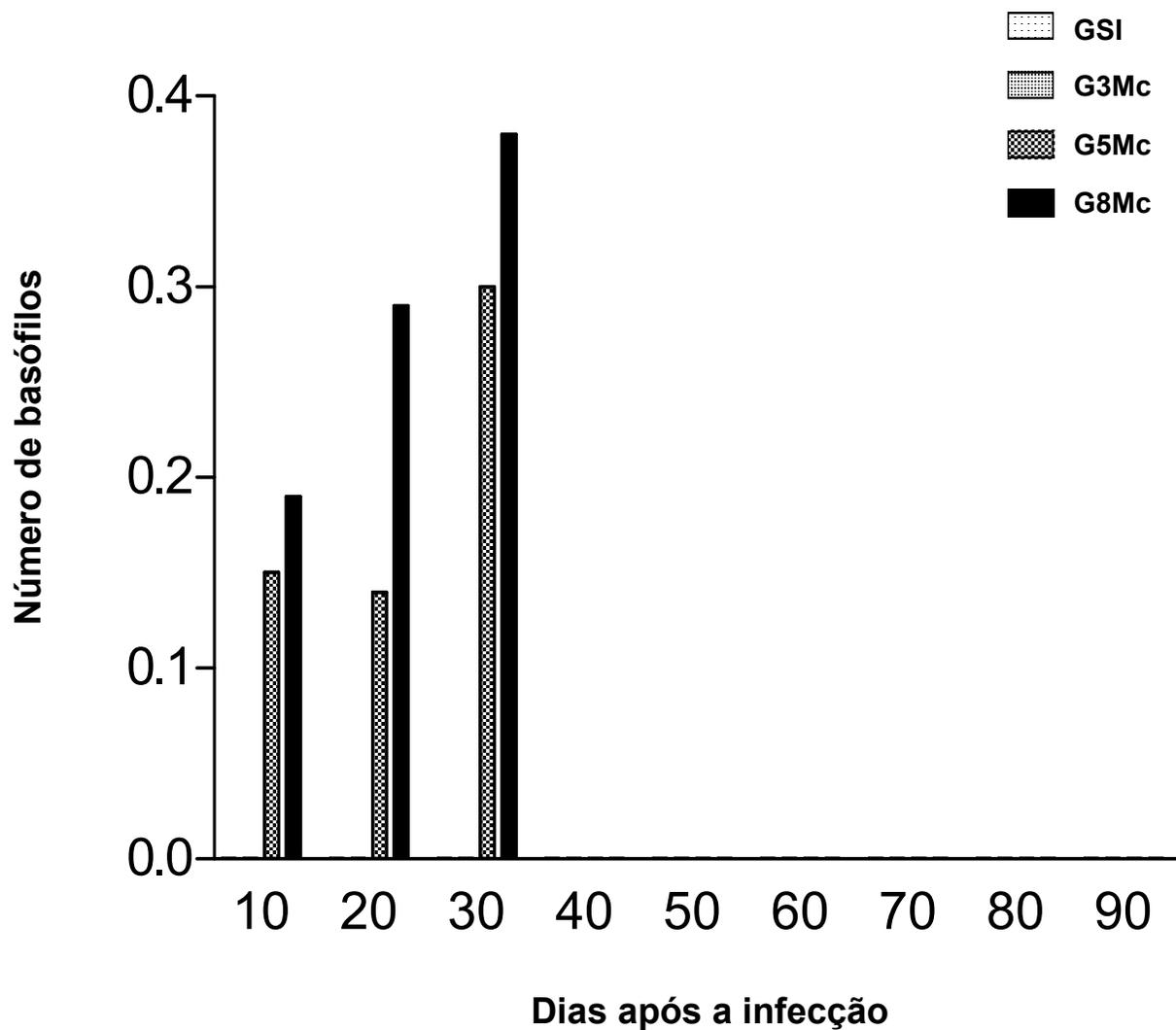


FIGURA 18 – Valores médios do número de basófilos dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.

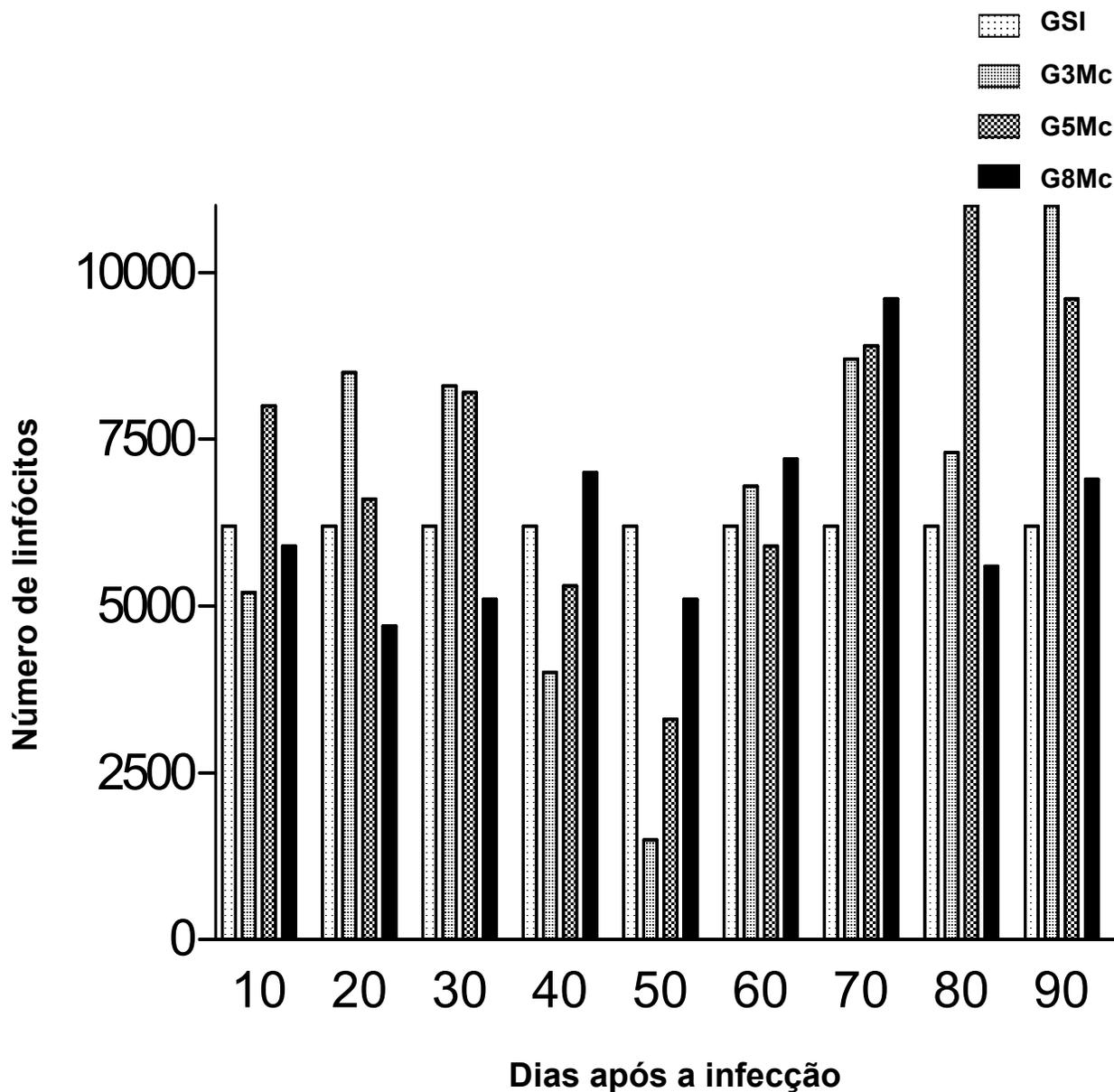


FIGURA 19 – Valores médios do número de linfócitos dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.

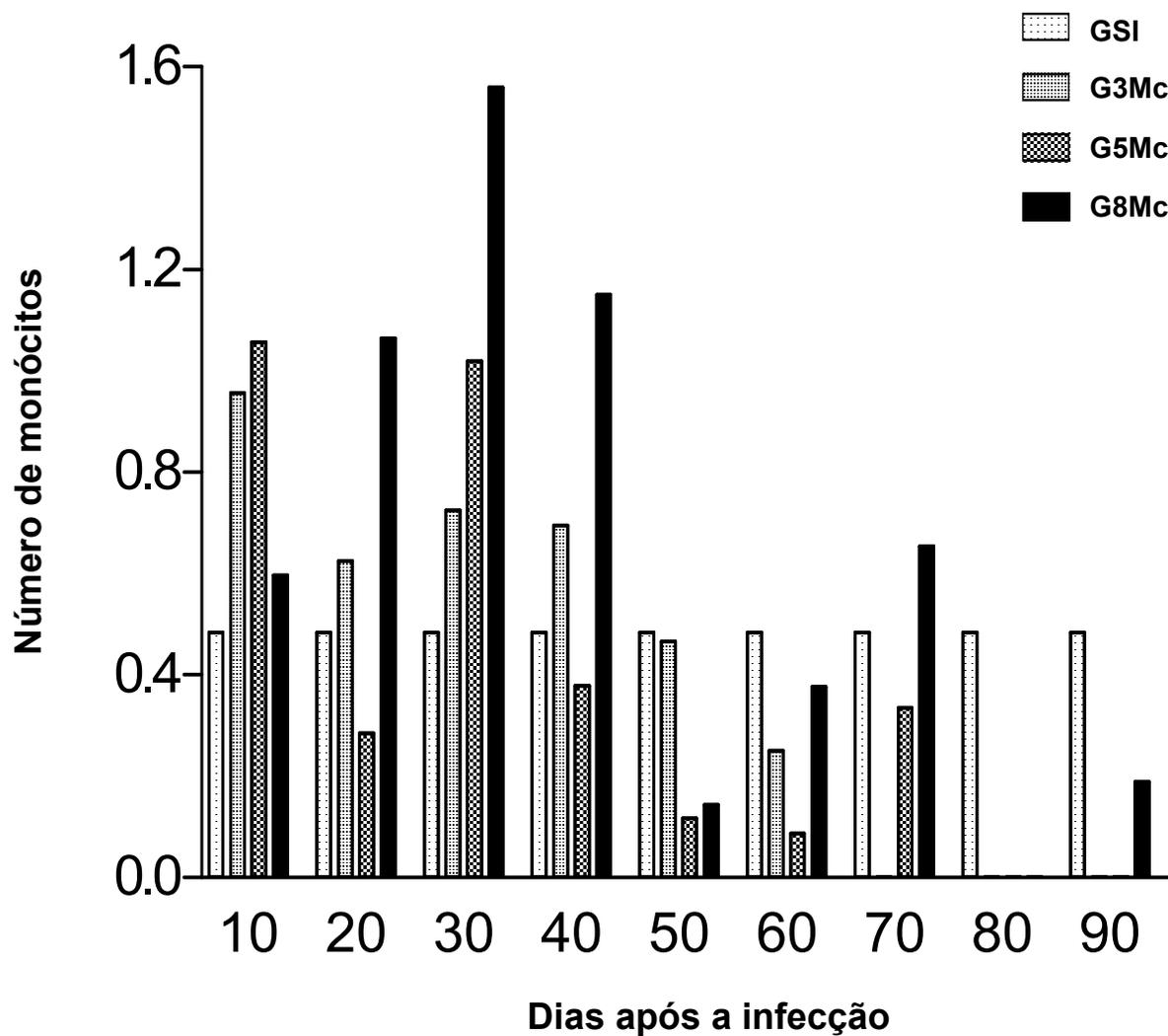


FIGURA 20 – Valores médios do número de monócitos dos *Meriones unguiculatus* grupo controle (GSI) e infectados experimentalmente com três metacercárias (G3Mc), cinco metacercárias (G5Mc) e oito metacercárias (G8Mc) de *Fasciola hepatica* de bovinos.

8. DISCUSSÃO

8.1. Dinâmica da eliminação de ovos de *F. hepatica* na infecção de *C. penicillata*

O emprego de primatas não humanos em pesquisas biomédicas desperta interesse principalmente na similaridade filogenética, bioquímica e fisiológica que estes animais apresentam com o homem. A criação e manutenção de primatas da família Callitrichidae em condições de laboratório apresenta entre outras vantagens fácil manejo e baixo custo quando comparado com outros primatas (Pereira & Melo, 1983; Melo & Pereira, 1985).

Na infecção experimental dos três *C. penicillata* os períodos pré-patentes variaram entre 42 a 47 dias, com uma média de $44,3 \pm 2,51$ dias após a infecção, observando-se durante o período experimental uma eliminação de ovos com médias significativamente altas na maioria dos intervalos. A produção diária de ovos por grama de fezes variou em média para um dos *C. penicillata* no período de maior eliminação, 330 dias após a infecção, entre 1.089 a 4.356 ovos. Dados semelhantes em relação ao período pré-patente foram encontrados por Coelho (2001), que infectou experimentalmente dois *C. penicillata* com 30 Mc de *F. hepatica* e observou os primeiros ovos nas fezes aos 42 dias após a infecção. No entanto, após determinar o período pré-patente, o autor não acompanhou como o realizado neste trabalho a eliminação de ovos do parasito por um longo período.

De acordo com Boray (1969), o período pré-patente de *F. hepatica* varia consideravelmente entre as diferentes espécies de hospedeiro, dependendo da

suscetibilidade, carga parasitária e número de parasitos no fígado. Em pequenos animais de laboratório o desenvolvimento do parasito aparentemente ocorre mais rápido quando comparado ao desenvolvimento em ruminantes.

Os resultados encontrados, quando relacionados aos de Tomimura *et al.* (1975), que infectaram experimentalmente primatas do gênero *Macaca* com metacercárias de *F. hepatica* apontam para o fato de que em animais menores e, sobretudo em primatas menores o desenvolvimento do parasito foi mais rápido. A média do número de ovos eliminados diariamente, observada aos 360 dias após o período pré-patente mostra que os animais mantiveram a infecção por um longo período eliminando um número significativo de ovos nas fezes confirmando a suscetibilidade e a possibilidade da utilização destes como modelos experimentais adequados para manutenção do ciclo biológico de *F. hepatica* em laboratório.

8.2. Dinâmica da eliminação de ovos de *F. hepatica* na infecção de *M. unguiculatus*

No experimento realizado utilizando *M. unguiculatus* como modelo experimental para manutenção em laboratório do ciclo biológico de *F. hepatica* o encontro dos primeiros ovos nas fezes ocorreu aos 53 dias após a infecção. Os períodos pré-patentes observados no “pool” dos animais machos e fêmeas e nos animais positivos mostram-se semelhante aos relatos de Leon-Dancel (1970), que relatou um período pré-patente de 51 dias para *Rattus norvegicus*.

O encontro de ovos de *F. hepatica* nas fezes dos *M. unguiculatus* infectados experimentalmente, apresentado neste trabalho mostra a suscetibilidade destes roedores a infecção pelo Trematoda, característica já relatada por Helfer & Knapp (1968) que avaliem estes animais como modelos experimentais para o estudo da patologia do parasito, embora estes não relatassem o encontro de ovos do parasito nas fezes.

Apesar de verificar a eliminação de ovos do parasito na infecção experimental de *M. unguiculatus*, até o momento não observado por outros autores, o encontro de baixo número de ovos eliminados nas fezes destes animais, assim como também o não desenvolvimento de miracídios, permite concluir que os mesmos não são animais adequados para a manutenção do ciclo de *F. hepatica* em laboratório.

8.3. Variabilidade morfológica dos ovos de *F. hepatica*

As análises morfométricas das medidas de comprimento de ovos de *F. hepatica* realizadas neste trabalho mostraram a ocorrência de diferenças morfológicas nos ovos de *F. hepatica* oriundos de bovinos antes e após a passagem do parasito em *C. penicillata* e *M. unguiculatus* infectados experimentalmente, permitindo sugerir a influência do tipo de hospedeiro vertebrado no qual o parasito se desenvolve.

Embora a avaliação morfométrica de ovos de *F. hepatica* oriunda de *C. penicillata* e *M. unguiculatus* infectados experimentalmente ainda não tenham

sido relatadas, diferenças morfológicas nos ovos do parasito, relacionadas ao tipo de hospedeiro vertebrado já foram descritas por outros autores (Costa *et al.*, 1987; Abrous *et al.*, 1998; Valero *et al.*, 1998)

8.4. Produção de rédias e metacercárias de *F. hepatica*

Além das diferenças morfológicas que os ovos de *F. hepatica* apresentam em relação ao tipo de hospedeiro, o desenvolvimento embrionário e a liberação e viabilidade dos miracídios originados destes ovos também são características da biologia do parasito que se encontram diretamente relacionados ao tipo de hospedeiro no qual o parasito se desenvolve.

No experimento realizado os resultados encontrados demonstraram que o número médio de rédias e metacercárias originadas da infecção de *L. columella* por miracídios de ovos de *F. hepatica* oriunda de bovinos foi superior ao número das formas evolutivas originadas de ovos do parasito na infecção experimental dos *C. penicillata*. Os ovos eliminados pelos parasitos que completaram seu desenvolvimento em bovinos foram mais eficientes na infecção do hospedeiro intermediário, durante todo o período experimental, permitindo sugerir a influência do tipo de hospedeiro definitivo no desenvolvimento de *F. hepatica* no hospedeiro intermediário.

Esta influência foi discutida por Vignoles *et al.* (2004), que realizaram a infecção experimental de *Galba truncatula* com miracídios originados de ovos de *F. hepatica* de bovinos, ovinos, nutrias e coelhos. Os autores relataram que

G. truncatula infectada por miracídios originados de ovos de *F.hepatica* de bovinos desenvolveram número de rédias e número de cercárias duas vezes maior que os moluscos infectados por miracídeos de ovos do parasito originados dos outros hospedeiros vertebrados.

Na infecção dos *M. unguiculatus* infectados por *F. hepatica* de bovinos após a passagem em *C. penicillata*, os ovos eliminados nas fezes e mantidos nas mesmas condições que os obtidos na infecção dos outros dois hospedeiros não formaram miracídios. Baseado no fato de que o desenvolvimento embrionário dos ovos não ocorreu, esses foram considerados inviáveis.

Provavelmente a passagem do parasito oriundo de bovinos em *C. penicillata* e *M. unguiculatus* aliada às características próprias do hospedeiro, influenciaram no desenvolvimento do parasito originando ovos inviáveis. Boray (1969) relatou que a infecção do hospedeiro intermediário, após a quarta passagem do parasito em coelhos, foi impossível, pois os ovos resultantes formaram miracídios inviáveis que não eclodiram. Segundo Rondelaud & Dreyfuss (1995), ovos eliminados por hospedeiros não comuns têm menor habilidade em se desenvolver e originar miracídios.

8.5. Alterações patológicas macroscópicas e microscópicas

A patologia de *F. hepatica* está associada primariamente ao número de metacercárias ingeridas, a carga parasitária resultante e às fases de migração

dos vermes imaturos pelo parênquima hepático e vermes adultos pelos ductos biliares (Boray, 1969).

A migração do parasito por outros órgãos, além do fígado, foi confirmada em 20,5% dos *Meriones unguiculatus* infectados experimentalmente com três, cinco e oito metacercárias de *F. hepatica* através do encontro de ovos ou de verme imaturo e adulto de *F. hepatica* e das análises microscópicas do , pulmões, baço, diafragma, linfonodos mesentéricos e rins.

Em todos estes órgãos ficou evidente a infecção e passagem do parasito devido às alterações causadas pelo traumatismo mecânico e a alimentação deste ocasionando o surgimento de áreas hemorrágicas, focos de necrose e reação inflamatória.

No presente estudo as alterações macroscópicas encontradas no intestino delgado foram condizentes com os relatos de Dawes (1963a), que descreveu na infecção experimental de camundongos a presença de pontos hemorrágicos na serosa.

As áreas de hemorragias antigas encontradas nos pulmões de um gerbil infectado com cinco metacercárias aos 30 DPI, mostraram, como nos relatos de Sinclair (1967), a passagem do parasito através das paredes do órgão.

Antes de atingirem o fígado os vermes imaturos comumente atravessam o diafragma e migram até os pulmões (Sinclair, 1967). Os pontos hemorrágicos encontrados na parede do diafragma de um animal infectado com três metacercárias de *F. hepatica* aos 80 dias após a infecção foram condizentes com as observações de Sinclair (1967) e Thorpe (1965) que relataram a

passagem de vermes imaturos através do diafragma para alcançarem os pulmões.

Dawes (1963a) demonstrou através da histologia a passagem e alimentação de vermes imaturos de *F. hepatica* em tecidos linfóides e adiposos. Neste trabalho as alterações caracterizadas nos linfonodos mesentéricos do animal infectado com três metacercárias aos 80 dias que apresentou as alterações citadas no diafragma demonstraram a presença de ovos do parasito no tecido e a ocorrência de tecido adiposo, também repleto de ovos do parasito, aderido aos linfonodos mesentéricos.

No baço de um animal infectado com três metacercárias aos 20 dias após a infecção as alterações encontradas, caracterizando os vários espaços vazios, formação de túneis, destruição celular, hemorragia, surgimento de focos de necrose e reação inflamatória foram sugestivos, indicando lesões em outros órgãos linfóides ocasionadas possivelmente devido à passagem e a alimentação de *F. hepatica*.

O exame macroscópico e microscópico do rim direito de um animal infectado com 8Mc aos 40 dias após a infecção mostrando a presença de hemorragia, intensa reação inflamatória e formação de granuloma ao redor de ovos de *F. hepatica* presentes no parênquima do órgão, revelou, por meio deste trabalho, a passagem e alimentação de um verme adulto de *F. hepatica* dentro de um órgão ainda não relatado na literatura.

A presença de ovos de *F. hepatica* nos linfonodos mesentéricos, diafragma e rim direito sugerem que tanto o verme imaturo quanto o verme

adulto após penetrar ou não no fígado podem abandoná-lo indo se alimentar em outros órgãos.

A maioria das lesões encontradas se concentraram no fígado indicando a “preferência” do parasito. Esta “preferência” foi demonstrada por Dawes (1961) que observou através de fotomicrografias a presença de restos e até hepatócitos inteiros no ceco de vermes imaturos indicando que a alimentação do parasito constitui-se preferencialmente de células hepáticas sendo o sangue ingerido acidentalmente.

Os túneis preenchidos por hemácias, secreções do parasito, debris celulares e hepatócitos comprimidos, associados ao encontro de parasitos e ovos de *F. hepatica* durante as necropsias, confirmam as lesões causadas na infecção pelo parasito durante a sua migração e alimentação no parênquima hepático. O surgimento de áreas hemorrágicas, focos de necrose e infiltrado inflamatório ao redor destas áreas foram condizentes com os relatos de Dawes (1961, 1963a, b, c), Thorpe (1965), Sinclair (1967) que observaram alterações macroscópicas e microscópicas semelhantes em camundongos, coelhos e ovinos, respectivamente.

As alterações patológicas macroscópicas foram similares às encontradas por Thorpe (1965) e Helfer & Knapp (1968) que ao avaliarem a utilização de ratos e gerbil (*M. unguiculatus*) como modelos experimentais para o estudo de *F. hepatica* encontraram lesões no fígado caracterizadas por aumento de volume, áreas de hemorragia, necrose e fibrose do parênquima hepático.

8.6. Perfil hematológico na infecção de *M. unguiculatus* infectados por diferentes números de metacercárias de *F. hepatica*

O valor médio do hematócrito dos animais do grupo controle dos *M. unguiculatus* correspondeu aos encontrados nos estudos realizados por Mays (1969) e Dillon & Glomski (1975) que observaram médias de 47.5 e 49.25% para os animais machos e 45.8 e 46.8% para as fêmeas da mesma espécie.

Os valores significativamente inferiores do hematócrito dos animais infectados com três metacercárias que ocorreram em relação aos animais dos grupos controle e animais dos grupos infectados com cinco e oito metacercárias na maioria dos intervalos observados, especialmente aos 70 dias após a infecção. Estes achados sugerem uma maior e progressiva perda de eritrócitos nos animais infectados com menor carga parasitária associadas provavelmente a um maior volume de sangue ingerido por parasito.

Nos animais infectados com cinco e oito metacercárias aos 10 dias após a infecção, as quedas significativas que ocorreram no valor do hematócrito sugerem uma rápida perda de eritrócitos no início da infecção associada a uma maior carga parasitária e a um menor volume de sangue perdido por parasito permitindo em seguida a reposição destes pela medula óssea.

De acordo com Sinclair (1972), nas infecções com menor carga parasitária ocorre maior e progressiva perda de eritrócitos devido a um volume maior de sangue ingerido por parasito. Nas infecções com maior carga parasitária a rápida perda de eritrócitos logo após a infecção seguida pela

reposição destes deve-se a um menor volume de sangue perdido por um maior número de parasitos, permitindo a reposição pela medula óssea.

No entanto, os resultados encontrados após o intervalo de 30 dias, especialmente aos 40, 50 e 70 dias nos animais infectados com três metacercárias, aos 60 dias nos animais infectados com cinco metacercárias e aos 50 dias nos animais infectados com oito metacercárias, apresentando quedas significativas no valor do hematócrito nestes intervalos permitem sugerir que nas infecções prolongadas ocorrem novas perdas de eritrócitos, possivelmente associadas à deficiência da medula óssea em repor o volume de células perdidas.

Os fatores que em conjunto conduzem à anemia progressiva que ocorre na fasciolose são a hemorragia causada pela migração e alimentação do parasito nos ductos biliares com exacerbada hiperplasia epitelial associadas provavelmente à deficiência da medula óssea ou à reposição tardia do volume de sangue perdido (Sinclair, 1964, 1972). O que pode ter ocorrido neste trabalho.

As contagens global de leucócitos dos animais infectados com três, cinco e oito metacercárias de *F. hepatica* na maioria dos intervalos foi superior às dos animais do grupo controle, sugerindo um aumento no número de leucócitos em resposta a infecção. Sinclair (1962), Poitou *et al.* (1993) e Martínez-Moreno *et al.* (1997) observaram fato semelhante relatando um aumento progressivo no número de total de leucócitos no sangue periférico de ratos e ovinos nas

primeiras semanas após a infecção, seguido por variações associadas ao aumento do número de neutrófilos.

Nas infecções por *F. hepatica* o hospedeiro vertebrado responde com uma intensa reação inflamatória celular. As áreas hemorrágicas, observadas neste trabalho, deixados pelo parasito durante sua migração através do parênquima hepático, mostraram como nos achados de Dawes (1963b), a presença de células polimorfonucleares e mononucleares circundando estes espaços.

No presente estudo o aumento verificado no número de células do sangue periférico dos *M. unguiculatus* infectados por *F. hepatica* foi semelhantes aos resultados encontrados por Keegan & Trudgett (1992).

Os valores médios do número de neutrófilos segmentados dos animais dos grupos infectados foram significativamente superiores ao dos animais do grupo controle sugerindo um mecanismo dinâmico na participação destas células durante a infecção. Nos animais infectados com oito metacercárias os valores significativamente superiores observados no presente estudo, aos 10, 30, 40 e 60 dias, especialmente os picos encontrados aos 10 e 40 dias sugerem o desenvolvimento de uma resposta inflamatória celular acentuada provocando aumento na produção destas células em resposta provavelmente a uma maior carga parasitária e ocorrência, possivelmente de maiores danos aos tecidos.

Os picos encontrados aos 70 e 90 dias para os animais infectados, respectivamente, com três e cinco metacercárias, no presente estudo, sugerem

uma resposta celular inespecífica e surgimento de uma reação inflamatória acentuada nos estágios mais prolongados da infecção possivelmente associados a uma menor carga parasitária.

A ocorrência de neutrófilos bastonetes apenas nos animais infectados e aos 30, 40 e 50 dias após a infecção implica provavelmente na progressão da resposta com conseqüente migração de neutrófilos segmentados para os tecidos e uma rápida liberação de neutrófilos bastonetes para a circulação. A ausência de neutrófilos bastonetes nos intervalos prolongados da infecção sugere uma menor demanda por neutrófilos segmentados indicando provavelmente uma diminuição na resposta do hospedeiro.

Os valores médios do número absoluto de linfócitos dos animais infectados, encontrados neste trabalho, foram superiores aos dos animais do grupo controle na maioria dos intervalos, demonstrando o envolvimento destes na resposta do hospedeiro. Segundo Sinclair (1967), além do aumento significativo de neutrófilos, freqüentemente o aumento de linfócitos também ocorre nas infecções por *F. hepatica*. Aos 50 dias após a infecção os três grupos de animais infectados apresentaram uma significativa redução no número médio de linfócitos circulantes ocorrendo nos intervalos seguintes um novo aumento sugerindo como nos achados de Sinclair (1972) e Poitou *et al.* (1993) a ocorrência de quedas no número de linfócitos em resposta a um maior número de neutrófilos no sangue circulante, com contínua produção destes pela medula óssea, sugerindo uma resposta celular inflamatória inespecífica.

Na infecção de ratos por *F. hepatica* a participação de células basófilos e monócitos ocorrem apresentando aumentos significativos sete e duas semanas após a infecção, respectivamente (Poitou *et al.*,1993). Os valores médios do número absoluto de monócitos, observados neste trabalho, nos intervalos iniciais da infecção explicam a participação destas células no processo inflamatório, ocorrendo inicialmente um aumento devido à migração destas células para o local da inflamação em resposta às lesões provocadas e a substâncias liberadas pelo parasito.

A queda posterior nos valores médios de monócitos e ausência de basófilos nos animais infectados com menor carga parasitária, demonstrada no presente estudo, nos intervalos finais da infecção sugerem uma menor e ou diminuição da resposta do hospedeiro. Nos animais infectados com maior carga parasitária os resultados mostrando a ocorrência de células basófilos e os valores significativos encontrados para o número de células monócitos, especialmente, nos animais infectados com oito metacercárias, demonstram que estes resultados podem estar associados a uma maior carga parasitária.

Nas infecções por *F. hepatica* o hospedeiro desencadeia uma resposta imune humoral e celular e uma resposta inespecífica de células inflamatórias. Aparentemente a resposta celular é a mais relevante, no entanto, a natureza dos mecanismos que envolvem esta resposta, ainda não são claramente conhecidos (Haroun & Hillyer, 1986; Martínez-Moreno *et al.*, 1997).

9. CONCLUSÕES

- Os ovos de *Fasciola hepatica* eliminados na infecção dos *Callithrix penicillata* são viáveis, capazes de originar miracídios que infectam *Lymnaea columella* ocorrendo formação de metacercárias.
- *Callithrix penicillata* podem ser utilizados como animais de laboratório adequados para a manutenção do ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.
- Os *Meriones unguiculatus* se infectam com *Fasciola hepatica* de bovinos naturalmente infectados após a passagem em *Callithrix penicillata*.
- O período pré-patente de *Fasciola hepatica* na infecção experimental dos *Meriones unguiculatus* é de 53 dias após a infecção.
- Os ovos de *Fasciola hepatica* eliminados na infecção dos *Meriones unguiculatus* são inviáveis, tornando os mesmos não adequados como modelos de laboratório para a manutenção do ciclo biológico.
- Ovos de *Fasciola hepatica* oriundos de bovinos naturalmente infectados apresentaram, após a passagem em *Callithrix penicillata* e *Meriones unguiculatus*, diferenças morfológicas no comprimento.
- O número de estádios evolutivos originados de *Fasciola hepatica* de bovinos foi superior ao número das formas evolutivas originadas de *Fasciola hepatica* de *Callithrix penicillata*.
- *Meriones unguiculatus* infectados com diferentes cargas parasitárias de *Fasciola hepatica* apresentam alterações macroscópicas e microscópicas que se concentraram principalmente no fígado.

- *Meriones unguiculatus* infectados com diferentes cargas parasitárias de *Fasciola hepatica* apresentam uma resposta celular caracterizada principalmente pelo aumento de neutrófilos, linfócitos e monócitos.

10. Referências bibliográficas

ABÍLIO, F.J.P. & WATANABE, T. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, para o Estado da Paraíba, Brasil. *Rev. Saúde Publ.*, Sao Paulo, v. 32, n. 2, p. 185-186, 1998.

ABROUS, M.; COMES, A.M.; GASNIER, N.; RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G.; CHAUVIN, A.; MÉNARD, A.; AGOULON, A. & CABARET, J. Morphological variability in *Fasciola hepatica* eggs in ruminants, rodents and lagomorphs. *J. Helminthol.*, v. 72, p. 313-317, 1998.

AMATO, S.B.; REZENDE, H.E.B.; GOMES, D.C. & SERRA-FREIRE, N.M. Epidemiology of *Fasciola hepatica* in the Paraíba River Valley, São Paulo, Brasil. *Vet. Parasitol.*, v. 22, n. 3-4, p. 275-284, 1986.

BECK, A.A.H. Fasciolose. *A Hr. Vet.*, n. 75, p. 65-70, 1993.

BERNE, M.E.A. *Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de Fasciola hepatica através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnóstico*. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, 168p. 1994.

BORAY, J.C. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.*, v. 7, p. 95-210, 1969.

BORAY, J.C. The potencial impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australasia. *Vet. Parasitol.*, v. 4, p. 127-141, 1978.

BORAY, J.C.; FRASE, G.C.; WILLIAMS, J.D. & WILSON, J.M. The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on grazing areas in New South Wales and

studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. *Aust. Vet. J.*, v. 62, n. 1, p. 4-6, 1985.

CARVALHO, J.C.M. Contribuição para o conhecimento da fauna helmintológica de Minas Gerais. *Ceres*, Viçosa. v. 1, n. 5, p. 411-423, 1940.

CALDAS, W.S.; LIMA, W.S.; CURY, M.C.; MALACCO, M.A.F. & SILVA, R.S. Prevalência de *Fasciola hepática* em bovinos de algumas mesorregiões do Estado de Minas Gerais. In : SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA ,9, 1995, Campo Grande-MTS, 1995. p. 140.

COELHO, L.H.L. *Variação populacional e dinâmica de infecções de Lymnaea columella por Fasciola hepatica no município de Itajubá, MG*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, 66p., 2001.

COELHO, L.H.L. & LIMA, W.S. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais. *J. Helminthol.*, v. 77, p. 7-10, 2003.

CORRÊA, O. Incidência de hidatidose, fasciolose, estefanurose e cisticercose nos rebanhos riograndenses. *Rev. Fac. Agron. Vet.* Porto Alegre, v.7, n.2, p. 137-146, 1965.

COSTA, N.C.; SILVA SANTOS, I.C. & BOTELHO, G.A. *Myocastor coypus* MOLINA, 1782 (Rodentia, Echymidae) naturalmente infectado com *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758 (Trematoda, Fasciolidae). *A Hora Veterinária*, Ano 6, n. 36, p. 24-26, 1987.

DACAL, A.R.M.; COSTA, H.M.A. & LEITE, A.C.R. Susceptibilidade de *Lymnaea* (Pseudosuccinea) *columella* (Say, 1817) exposta à infecção por miracídios de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 361-369, 1988.

DAWES, B. On the early stages of *Fasciola hepatica* penetrating into the liver of an experimental host, the mouse: a histological picture. *J. Helminthol.*, Supplement., p. 41-52, 1961.

DAWES, B. The migration of juvenile forms of *Fasciola hepatica* L. through the wall of the intestines in mouse, with some observations on food and feeding. *Parasitol.*, v. 53, n. 1-2, p. 109-122, 1963a.

DAWES, B. Hyperplasia of the bile duct in fascioliasis and its relation to the problem of nutrition in the liver-fluke, *Fasciola hepatica* L. *Parasitol.*, v. 53, n. 1-2, p. 123-133, 1963b.

DAWES, B. Some observations of *Fasciola hepatica* L. during feeding operations in the hepatic parenchyma of the mouse, with notes on the nature of liver damage in this host. *Parasitol.*, v. 53, n. 1-2, p. 135-143, 1963c.

DILLON G.W. & GLOMSKI C.A. The Mongolian gerbil: Qualitative and quantitative aspects of the cellular blood picture. *Lab. Anim.*, v. 8, p. 283-287, 1975.

ECHEVARRIA, F.A.M.; CORREA, M.B.C. & WEHRLE, R.D. Experiments on anthelmintic control of *Fasciola hepatica* in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 43, p.211-222, 1992.

ESPINO, A.M.; MARCET, R. & FINLAY, C.M. *Fasciola hepatica*: Detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. *Exp. Parasitol.*, v. 85, p. 117-120, 1997.

FARIA, R.N. *Prevalência e dinâmica da infecção por Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) em bovinos no município de Itajubá – Minas Gerais*. Belo Horizonte. UFMG. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, 64p. 2000.

FERREIRA NETO J.; VIANA E.S. & MAGALHÃES L.M. *Patologia clínica veterinária*. Belo Horizonte, Rabelo, 1982. 279p.

FRANÇA, I. *Fasciola hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba. Boletim do Campo, Rio de Janeiro, n. 230, p. 21-22, 1969.

GIRÃO, E.S. & UENO, H. Nova técnica de contagem de ovos para o diagnóstico de fasciolose crônica em ruminantes. *In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA*. Porto Alegre-RS. *Anais...* Porto Alegre, 36p. 1982.

GOMES, C.D. *Interrelação entre Fasciola hepatica L., 1758 e Lymnaea columella Say, 1817: susceptibilidade e patogenia*. Tese (Doutorado) Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, Rio de Janeiro, 73p. 1985

HAROON, E.M. & HILLYER, G.V. Resistance to fascioliasis. *Vet. Parasitol.*, v. 4, p. 127-141, 1986.

HAROUN, E.M. & HILLYER, G.V. Cross-resistance between *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica* in sheep. *J. Parasitol.*, v. 74, n. 5, p. 790-795, 1988.

HELPER, H.D. & KNAPP, E.S. The gerbil- A new experimental host for *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, v. 54, n. 6, p. 1240-1241, 1968.

HURTREZ-BOUSSÈS, S.; MEUNIER, C.; DURAND, P. & RENAUD, F. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes Infect.*, v. 3, p. 841-849, 2001.

HONER, M.R. Aspectos da epidemiologia da fasciolose *in*: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITÓSES DE BOVINOS, 1, 1979, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: EMBRAPA/CNPGC, 1979. 386p.

JIMENEZ-ALBARRAN, M. & GUEVARA-POZO, D. Estudios experimentales sobre biología de *Fasciola hepatica*: 1 – Numero y viabilidad de los huevos de *Fasciola hepatica* hallados en vesícula biliar de vaca, oveja y cabra. *Rev. Ibér. Parasitol.*, v. 37, n 3-4, p. 291-300, 1977.

KEEGAN, P.S. & TRUDGETT, A. *Fasciola hepatica* in rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunol.*, v. 14, p. 657-669, 1992.

LEON-DANCEL, D. Life history of *Lymnaea columella* (Say) and its experimental infection with *Fasciola hepatica*. *J. Agr. Univ. Puerto Rico*, n. 54, p. 297-305, 1970.

LEUCKART, R.; Zur Entklick Lungsgeschichte des lebergels (*Distomum hepaticum*). *Archiv fur Naturgeschichte*, n.48, p. 80-119, 1882.

LUTZ, A. Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. *Bol. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 9-13, 1921.

MARTÍNEZ-MORENO A.; MARTÍNEZ-MORENO F.J.; ACOSTA I.; GUTIÉRREZ P.N.; BECERRA C. & HERNÁNDEZ S. Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitol. Res.*, v. 83, p. 680-686, 1997.

MAYS A. JR, Baseline hematological and blood biochemical parameters of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab. Anim. Care*, v. 19, n. 6, p. 838-842, 1969.

MELO, A. L. & PEREIRA, L. H. Sobre o parasitismo por *Primasubulura jacchi* em *Callithrix penicillata* (Primates, Callitrichidae). *A Primatologia no Brasil – 2*. M. T. de Melo (ed), p. 483-488. Sociedade Brasileira de Primatologia, Brasília, 1985.

MÉNARD, A.; L'HOSTIS, M.; LERAY, G.; MARCHANDEAU, S.; PASCAL, M.; ROUDOT, N.; MICHEL, V. & CHAUVIN, A. Inventory of wild rodents and lagomorphs as natural hosts of *Fasciola hepatica* on a farm located in a humid area in Loire Atlantique (France). *Parasite*, v. 7, p. 77-82, 2000.

MILBOURNE, E.A. & HOWELL, M.J. Eosinophil to responses to *Fasciola hepatica* in rodents. *Int. J. Parasitol.*, v. 20, n. 5, p. 705-708, 1990.

PARAENSE, W.L. *Lymnaea rupestris* SP. N. from southern Brazil (Pulmonata:Lymnaeidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 77, n. 4, p. 437-443, 1982.

PARAENSE, W.L. *Lymnaea columella*: two new Brazilian localities in the states of Amazonas and Bahia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 81, n. 1, p. 121-1233, 1986.

PEREIRA, L. H. & MELO, A. L. Observações sobre a criação de *Callithrix penicillata* (Primates, Callitrichidae) em cativeiro. *A Primatologia no Brasil*. M. T. de Melo (ed), p. 129-132. Sociedade Brasileira de Primatologia, Brasília, 1983.

POITOU, I.; BAEZA, E. & BOULARD, C. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, v. 49, p. 179-190, 1993.

QUEIROZ, V.S.; LUZ, E.; LEITE, L.C. & CÍRIO, S.M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). *Acta Biol. Paranaense*, Curitiba, v. 31, n. 1-2-3-4, p. 99-111, 2002.

REZENDE, H.E.B. Retrospectiva da Fasciolose Bovina no Brasil. *In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITÓSES DE BOVINOS*. Campo Grande, MTS. *Anais...EMBRAPA/CNPGC*, p. 133-143, 1979.

RIBEIRO, P.A. Incidência das causas de rejeição de bovinos abatidos no Brasil Central-prejuízos causados pelas mesmas nos anos de 1946-47. *Rev. Fac. Méd. Vet.*, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 167-183, 1949.

RONDELAUD, D. & DREYFUSS, G. *Fasciola hepatica*: the influence of the host on the characteristics of infection in the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite*, v. 2, p. 275-280, 1995.

SILVA, I.C.; MULLER, G.; MATTOS, M.J.T.; CASTRO, A.L.D.; ALMEIDA, J.E.M. & UENO, H. Fasciolose. I - incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, v. 33, n. 323, p. 34-42, 1980.

SILVA, R.E.; LIMA, W.S.; CALDAS, W.S.; CURY, M.C. & MALACCO, A.F. Primeiro encontro de *Lymnaea columella* (Say, 1817) naturalmente infectada por estádios intermediários de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) na cidade de Itajubá, MG. *In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA*. Goiás, p. 205. 1995.

SINCLAIR, K.B. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *Br. Vet. J.*, v. 118, n. 37, p. 37-53, 1962.

SINCLAIR, K.B. Studies on the anaemia of ovine fascioliasis. *Br. Vet. J.*, v. 120, n. 5, p. 212-222, 1964.

SINCLAIR, K.B. Pathogenesis of *Fasciola hepatica* and other liver-flukes. *Helminthol.*, v. 36, n. 2, p. 115-134, 1967.

SINCLAIR, K.B. The pathogenicity of *Fasciola hepatica* in pregnant sheep. *Br. Vet. J.*, v. 128, n. 5, p. 249-259, 1972.

TAYLOR, E. L. La fascioliasis y el distoma hepático. F.A.O. *Estud. agr.*, n. 64, p. 1-250, 1965.

TERASAKI, K.; NODA, Y.; SHIBAHARA, T.; ITGAKI, T.; FUKUDA, K. & TSUCHIYA, K. Experimental fascioliasis in the rat-like hamster, *Tscherakia triton*, and other rodent hosts. *Parasitol. Int.*, v. 52, p. 147-154, 2003.

THORPE, E. Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. *Res. Vet. Sci.*, v. 6, n. 4, p. 498-509, 1965.

TOMIMURA, T.; KOTANI, T.; TAKEMOTO, Y.; YOKOTA, M.; YAMAGAMI, S. & YOSHIDA, H. Experimental fascioliasis in monkeys. I. Parasitological, clinical and pathological observations on monkeys infected with the "Japanese species" of *Fasciola*. *Jap. J. Vet. Sci.*, v. 37, p. 391-406, 1975.

THOMAS, A.P. Liver fluke in sheep. *Nature*, v. 26, p. 606-608, 1882. In TAYLOR, E. L. La fascioliasis y el distoma hepatico. F.A.O. *Estud. Agr.*, n. 64, p. 1-250, 1965.

UENO, H.; GUTIERRES, V.C.; MATTOS, M.J.T. & MULLER, G. Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 11, p. 185-191, 1982.

UETA, M.T. Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no vale do Paraíba, SP, Brasil. *Rev. Saúde Publ.*, Sao Paulo, v. 14, p. 230-233, 1980.

VAUGHAN, J.L.; CHARLES, J.A. & BORAY, J.C. *Fasciola hepatica* infection in farmed emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Aust. Vet. J.*, v. 75, n. 11, 1997.

VALERO, M.A.; MARCOS, M.D.; FONS, R. & MAS-COMA, S. *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitol. Res.*, v. 84, p. 188-194, 1998.

VALERO, M.A. & MAS-COMA, S. Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitol.*, v. 47, n. 1, p. 17-22, 2000.

VIGNOLES P.; MÉNARD A.; RONDELAUD D.; AGOULON A. & DREYFUSS G. *Fasciola hepatica*: the growth and larval productivity of redial generations in *Galba truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *J. Parasitol.*, v. 90, n. 2, p. 430-433, 2004