

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Rodolfo Silva Moreira Cezar

**ASPECTOS PARASITOLÓGICOS, CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS DE OVINOS  
DA RAÇA SANTA INÊS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR  
*Fasciola hepatica***

Belo Horizonte

2016

Rodolfo Silva Moreira Cezar

**ASPECTOS PARASITOLÓGICOS, CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS DE OVINOS  
DA RAÇA SANTA INÊS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR  
*Fasciola hepatica***

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

Orientador: Prof. Dr. Walter dos Santos Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Cíntia Aparecida de Jesus Pereira

Área de concentração: Helminologia

Belo Horizonte

2016

**Orientador**

**Professor Walter dos Santos Lima**

**Laboratório de Helmintologia Veterinária, Departamento de  
Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.**

**Co-Orientadora**

**Professora Cíntia Aparecida de Jesus Pereira**

**Laboratório de Helmintologia Veterinária, Departamento de  
Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.**

Belo Horizonte

2016

**Trabalho realizado no Laboratório de Helminologia  
Veterinária e Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasito  
do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Minas Gerais**

Belo Horizonte  
2016

Instituições que contribuíram para a realização deste trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas- Gerais-FAPEMIG

*Dedico a minha querida família.*

Meus agradecimentos ao Programa de *Pós-Graduação em Parasitologia*, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

## **Agradecimentos especiais:**

Ao professor Walter dos Santos Lima, por abrir as portas e me acolher no Laboratório de Helminologia Veterinária, por ensinar as dificuldades e a seriedade de se fazer pesquisa, por confiar e acreditar na minha pessoa, pelas oportunidades de crescimento e amadurecimento profissional. Por ser um exemplo de profissional, amante da Parasitologia e verdadeiro mestre, dedicado, dinâmico, atencioso, conselheiro, entusiasmado pelo saber e com foco nos resultados. Professor que nos estimula a realizar reflexões diárias sobre as nossas atitudes e aonde queremos chegar. “Não quero formar mão de obra, quero que aprenda a pensar”, “A última impressão é a aquela que fica, enquanto muitos dizem que é a primeira”, “ De onde não se espera, nada vem mesmo”, “Amigo é aquele que conhece os nossos defeitos e ainda assim, continua ao nosso lado”. Pessoa que se tornou amiga e, juntamente com sua família, me recebeu de braços abertos com muito carinho. Meu eterno muito obrigado pela preciosa orientação recebida durante todo o curso.

À professora Cíntia Aparecida de Jesus Pereira, pela co-orientação durante a realização desse trabalho. Pessoa metódica, observadora, paciente, cuidadosa, disponível, interessada e atenciosa. Muito obrigado.

Ao Professor Marcos Pezzi Guimarães pelas conversas, conselhos, ensinamentos e os incentivos constantes.

Ao Hudson Andrade dos Santos, por estar sempre pronto a ensinar com prazer, ajudar com muita atenção e paciência, mesmo com tanto trabalho a fazer. Obrigado pelo apoio e amizade.

Agradeço aos Professores Ricardo Fujiwara e Daniella Bartholomeu do Laboratório de Genômica e Imunologia de Parasitos pela estrutura disponibilizada. A técnica Michele e as alunas Denise e Luciana por auxiliarem na utilização do Coulter. Muito obrigado pela ajuda, carinho e atenção.

Ao Professor Ricardo Nascimento, por permitir acompanhá-lo nas aulas práticas de Parasitologia Veterinária e pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço à Sumara e Sibebe pela ajuda, carinho, atenção e o apoio durante esse período de estudo. Pessoas com o coração enorme e que nos tranquilizam com tanta gentileza.

## AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer:

A Deus, primeiramente, por ser meu companheiro, por me guiar, por iluminar os meus passos e os meus caminhos, por me proteger e me guardar.

Aos meus pais, Sérgio e Sônia, por todo o amor, carinho, amizade, compreensão, paciência e apoio, serei eternamente grato aos seus esforços. “Na vida as coisas não acontecem por uma questão de sorte, mas uma questão de escolha e o destino não é uma coisa que se espera, mas que se busca e conquista”.

Aos meus irmãos Vinícius e Frederico, pela amizade, pelas conversas, por sempre estarem ao meu lado e por compartilharem os momentos de alegrias e tristezas.

Aos meus familiares, Tio Antoninho e Tia Ruth, Tia Cristina, Tia Leninha, que sempre torceram por mim.

Aos amigos de Ouro Branco, Eduardo, Serginho, Renato, Luís Otávio, Mariana, Priscila e minha querida dindinha Tatiane. Obrigado a todos pela sincera amizade, coisa rara de se ter.

Aos amigos da Veterinária Magno, Fernando, Mateus e Gabriel pela torcida, por compreenderem a fase que estou vivendo. Todos temos objetivos e metas a serem atingidas. Seguimos caminhos profissionais distintos, no entanto a nossa amizade continua crescendo.

Aos colegas de laboratório Aytube, Vinícius, Wanderley, Lara, Jordana e Olívia, por compartilharem as dificuldades e as alegrias de se fazer pesquisa.

À turma do mestrado “Roliça”, constituída de pessoas e experiências tão diferentes, que, com suas histórias, tornaram as aulas de Parasitologia mais prazerosas e interessantes, além de proporcionar boas risadas, festas, churrascos e o bem maior, o conhecimento compartilhado. Especialmente agradeço a amizade do Bruno Warley, Daniela Nunes, Mayra, Denise, Ana, Renata, Vanessa, Samira e Vinícius.

A Ivana Rocha, pessoa que tive oportunidade de conhecer através da professora Héliida Andrade, e que trouxe muita alegria para minha vida, além de ser inteligente, dedicada e determinada, é um exemplo. Obrigado Héliida, por este presente.

Ao Marcos Malacco, pessoa entusiasmada, profissional sério e dedicado.

Ao Sr. Neri e Afonso pela amizade e o bate papo descontraído.

À Dona Aparecida, por sempre ter uma palavra amiga, por fazer comidas deliciosas e lembrar de mim sempre. Obrigado Dona Cida.

Ao Waldisio, pelas viagens seguras e tranquilas, além da boa vontade para ajudar no que for necessário. Muito obrigado.

Aos funcionários da fazenda Josué e João, por colaborarem com boa vontade e alegria durante o estudo realizado. Iaiá pelas comidas maravilhosas e o carinho.

Aos animais, por me proporcionarem paz, alegria e conhecimento. Principalmente pela compreensão, mesmo quando não são compreendidos os seus sentimentos. Obrigado por vocês existirem e serem um dos maiores motivos pelo qual sou apaixonado pela Medicina Veterinária.

Obrigado a todos que torceram e colaboraram de forma direta e indireta.

Forte abraço!

*“Sou perfeito, alegre e forte. Tenho amor e muita sorte, sou feliz e inteligente, vivo positivamente, tenho paz, sou um sucesso, tenho tudo que peço. Acredito firmemente no poder da minha mente, porque é Deus no subconsciente.” (Padre Lauro Trevisan)*

## RESUMO

*Fasciola hepatica* é um parasito presente nos ductos biliares de diversos mamíferos e causa grave morbidade e mortalidade, especialmente em rebanhos de ovinos. A fasciolose está em expansão em todas as regiões do Brasil e, em Minas Gerais, têm ocorrido relatos de infecção natural em hospedeiros definitivos, como bovinos, bubalinos, capivaras, e em hospedeiros intermediários, como a *Lymnaea* (= *Pseudosuccinea*) *columella*. A grande importância econômica da fasciolose está associada à perda de peso, queda na produção de leite, de carne, de lã e devido a abortos e gastos com tratamento nos rebanhos de ruminantes. Entretanto, os sinais clínicos presentes no desenvolvimento da doença nos animais não são reconhecidos com facilidade pelo técnico ou criador envolvido no sistema de produção. No Brasil, nos últimos anos, a ovinocultura ampliou-se de norte a sul do país, sendo a raça Santa Inês predominante nestes sistemas de criação. Por este motivo, o objetivo desse estudo foi avaliar a evolução da fasciolose em ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados, observando os parâmetros parasitológicos, clínicos e hematológicos. Utilizou-se 14 ovelhas da raça Santa Inês com dezoito meses de idade, peso médio de 24,5 kg e divididas aleatoriamente em dois grupos. Grupo 1 com nove animais, inoculados individualmente por via oral com 150 metacercárias de *F. hepatica*; Grupo 2 com cinco animais controle. Foram realizadas contagens de ovos por grama (OPG) de fezes e a avaliação da dinâmica de eliminação de ovos nas fezes a partir dos 55 dias após infecção (dpi), utilizando a técnica de quatro tamises, exames clínicos e hemograma aos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390 (dpi). Nesse estudo ficou comprovado que o período pré-patente variou entre 60 e 62 dpi, além disso, ovos foram eliminados nas fezes durante todo o período estudado. No exame clínico, os ovinos infectados revelaram prostração, edema submandibular, sensibilidade hepática dolorosa, taquicardia, taquipnéia, mucosa ocular hipocrômica, perda de score corporal e peso. No hemograma foi verificada anemia normocítica, normocrômica e regenerativa, com leucocitose por neutrofilia e eosinofilia, com posterior linfocitose. Os achados macroscópicos dos fígados dos ovinos que morreram revelaram aumento de volume, lóbulos com bordas abauladas, pontos hemorrágicos distribuídos difusamente pelo parênquima, focos de deposição de

fibrina na superfície do parênquima, focos de necrose com coloração avermelhada mais escura e presença de parasitos adultos nos ductos biliares.

## ABSTRACT

*Fasciola hepatica* is a parasite found in the bile duct of many mammal species, causing severe morbidity and death, especially in sheep. Fasciolosis is expanding throughout Brazil, and in Minas Gerais State it has been reported natural infection in definitive hosts such as cattle, buffalos and capybaras, as well as in *Lymnaea* (= *Pseudosuccinea*) *columella*, one of the intermediate hosts. The economic importance of fasciolosis is associated with weight loss, dropping milk, meat and wool production, abortion and treatment costs. However, the clinical signs of this disease are not easily recognized by the owner or technician involved in the animal production system. In the past few years, sheep farming has been expanding from north to south in Brazil and "Santa Inês" became the most reared breed. Therefore, this study aimed to evaluate the evolution of fasciolosis in Santa Inês sheep experimentally infected with *F. hepatica* through parasitological, hematological and clinical parameters. 14 female lambs of Santa Inês breed aged 8 months were randomly divided into two groups: Group 1 with 9 animals individually orally inoculated with 150 metacercariae of *F. hepatica*; and Group 2 with 5 non-infected animals. At 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390 days after infection (dai) four-sieves-technique was used to count eggs per gram of feces (EPG) in order to evaluate the dynamics of eggs eliminations in feces, and also clinical exams and hemogram. The results showed a prepatent period ranging from 60 to 62 dai, with egg elimination during the period observed. Clinical evaluation of the infected sheep revealed prostration, submandibular oedema, liver sensitivity, tachycardia, tachypnea, pale conjunctiva, loss of body condition and weight. The hemogram demonstrated normocytic normochromic and regenerative anemia, besides leukocytosis with neutrophilia and eosinophilia, with subsequent lymphocytosis. Macroscopic findings of the livers of two biopsied sheep revealed increased volume, lobes with curved edges, bleeding points distributed diffusely throughout the parenchyma, fibrin deposition in the surface of the parenchyma, dark red-colored necrotic foci, and adult worms in the bile ducts.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Cartão de análise para o método FAMACHA®.....	48
FIGURA 2	Contador hematológico automático (Modelo Bio – 2900 Vet – Bioeasy).....	50
FIGURA 3	Fígado do ovino nº 5 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 300 dias de infecção.....	73
FIGURA 4	Fígado do ovino nº 5 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 300 dias de infecção.....	73
FIGURA 5	Fígado do ovino nº 5 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 300 dias de infecção.....	73
FIGURA 6	Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 330 dias de infecção.....	74
FIGURA 7	Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 330 dias de infecção.....	74
FIGURA 8	Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 330 dias de infecção.....	74
FIGURA 9	Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 330 dias de infecção.....	74
FIGURA 10	Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 330 dias de infecção.....	75
FIGURA 11	Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após 330 dias de infecção.....	75

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Avaliação do escore da condição corporal dos ovinos.....	16
TABELA 2	Graus do método Famacha®, colorações das mucosas e hematócritos dos ovinos.....	47
TABELA 3	Número de ovos por grama de fezes (OPG) dos ovinos da raça Santa Inês infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepática</i> .....	53
TABELA 4	Parâmetro clínico de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepática</i> .....	54
TABELA 5	Parâmetro clínico de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepática</i> .....	55
TABELA 6	Índice Famacha© de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepática</i> .....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Frequência cardíaca dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	56
GRÁFICO 2	Frequência respiratória dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	57
GRÁFICO 3	Escore da condição corporal dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	59
GRÁFICO 4	Desenvolvimento ponderal dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	60
GRÁFICO 5	Valores médios de hematócrito dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	61
GRÁFICO 6	Valores médios das contagens totais de hemácias dos ovinos da raça Santa Inês controle e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	62
GRÁFICO 7	Valores médios da hemoglobina dos ovinos da raça Santa Inês controle e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> ...	63
GRÁFICO 8	Valores do volume corpuscular médio dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	64
GRÁFICO 9	Valores de concentração média de hemoglobina dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	65
GRÁFICO 10	Valores da concentração de hemoglobina corpuscular média dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	66
GRÁFICO 11	Valores médios das plaquetas dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	67
GRÁFICO 12	Valores médios absolutos das contagens totais dos leucócitos dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	68
GRÁFICO 13	Valores médios absolutos de neutrófilos dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	69
GRÁFICO 14	Valores médios absolutos de linfócitos dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	70
GRÁFICO 15	Valores absolutos médio de eosinófilos dos ovinos da raça Santa Inês controle e infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> .....	71

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Bpm	Batimento por Minuto
CC	Condição Corporal
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
cm	Centímetros
dL	Decilitros
DPI	Dias após a infecção
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
fl	Fenolitro
g	Gramma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Ht	Hematócrito
HE	Hematoxilina-Eosina
He	Hemácias
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	Imunoglobulina G
Kg	Quilograma
Le	Leucócito
MEC	Matriz extracelular
Mc	Metacercárias
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
OV	Ovino
OPG	Ovos por grama de fezes
PPP	Período pré-patente
pg	Picogramma
PL	Plaquetas

Rpm	Rotações por minuto
Rpm	Respiração por minuto
μL	Microlitro
Mm	Micrômetro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
VCM	Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
2.1 Aspectos gerais da ovinocultura .....	2
2.2 Histórico de <i>Fasciola hepatica</i> .....	3
2.3 Taxonomia .....	3
2.4 Ciclo biológico.....	3
2.5 Epidemiologia.....	5
2.5.1 No Brasil.....	5
2.5.2 Minas Gerais .....	7
2.6 Patogenia da fasciolose ovina .....	8
2.7 Sinais clínicos nos ovinos.....	10
2.8 Diagnóstico .....	14
2.8.1 Diagnóstico parasitológico .....	14
2.8.2 Diagnóstico clínico.....	15
2.8.2.1 Famacha .....	16
2.8.2.2 Escore de condição corporal.....	17
2.8.2.3 Ganho de peso.....	17
2.8.2.4 Influência da fasciolose no perfil hematológico de ovinos .....	18
2.8.2.5 Leucograma .....	20
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 Objetivos gerais.....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
5.1 Obtenção de ovos e miracídios.....	24
5.2 Origem e infecção experimental de <i>Lymnaea columella</i> por <i>F. hepatica</i> .....	24
5.3 Obtenção das metacercárias de <i>F. hepatica</i> .....	25
5.4 Infecção experimental dos ovinos da Raça Santa Inês por <i>F. hepatica</i> .....	26
5.5 Cinética da eliminação de ovos por grama de fezes <i>F. hepatica</i> .....	26
5.6 Avaliação clínica.....	27
5.7 Avaliação hematológica.....	31
5.7.1 Coleta de sangue dos ovinos.....	31
5.7.2 Contagem diferencial dos leucócitos .....	32
5.8 Avaliação macroscópica do fígado parasitado por <i>F. hepatica</i> .....	33
5.9 Análise estatística .....	33
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
6.1 Avaliação parasitológica .....	34
6.1.1 Dinâmica da eliminação de ovos de <i>Fasciola hepatica</i> .....	34
6.2 Parâmetros Clínicos.....	35
6.2.1 Frequência cardíaca.....	37
6.2.2 Frequência respiratória.....	38
6.2.3 Índice FAMACHA©.....	39
6.2.4 Escore da condição corporal .....	40
6.2.5 Desenvolvimento ponderal.....	41

6.3 Avaliação hematológica.....	43
6.3.1 Hematócrito .....	43
6.3.2 Contagem total de hemácias .....	44
6.3.3 Hemoglobina.....	44
6.3.4 Volume Corpuscular Médio .....	46
6.3.5 Concentração Média de Hemoglobina.....	47
6.3.6 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.....	48
6.3.7 Plaquetas .....	49
6.4 Leucograma .....	50
6.4.1 Contagens totais dos leucócitos .....	50
6.5 Contagem diferencial .....	51
6.5.1 Neutrófilos .....	51
6.5.2 Linfócitos .....	52
6.5.3 Eosinófilos .....	53
6.5.4 Monócitos .....	54
6.6 Necropsia .....	54
6.6.1 Avaliação macroscópica.....	54
6.7 Taxa de recuperação de <i>F. hepatica</i> .....	58
7 DISCUSSÃO .....	59
7.1 Dinâmica de eliminação de ovos de <i>F. hepatica</i> em ovinos da raça Santa Inês .....	59
7.2 Exame clínico .....	60
7.3 Famacha.....	62
7.4 Escore de condição corporal .....	62
7.5 Desenvolvimento ponderal.....	63
7.6 Perfil hematológico .....	65
7.6.1 Volume corpuscular médio .....	67
7.6.2 Concentração média de hemoglobina.....	68
7.6.3 Concentração de hemoglobina corpuscular média .....	68
7.6.4 Plaquetas .....	69
7.6.5 Leucograma .....	69
7.7 Avaliação macroscópica dos fígados.....	71
8 CONCLUSÕES .....	73
9 REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A1 – Ficha de avaliação clínica.....	75

## 1 INTRODUÇÃO

*Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) é um trematódeo digenético da família Fasciolidae que parasita os ductos biliares de diversos mamíferos, incluindo o homem. É agente etiológico da fasciolose e apresenta distribuição cosmopolita, com grande importância para a medicina veterinária, principalmente nas criações de ruminantes domésticos, devido às perdas econômicas ocasionadas, pelas condenações de fígados em frigoríficos, atraso no crescimento, perda de peso, diminuição na produção de leite, de carne, de lã, devido à baixa fertilidade, a abortos, e a gastos com o tratamento do rebanho e morte dos animais (Queiroz et al. 2002, Lima et al. 2009, Dracz & Lima 2014).

No Brasil, a fasciolose está em expansão e é encontrada em todas as regiões. Em Minas Gerais, os registros do parasito são apresentados de forma isolada, sendo que alguns municípios do sul do estado são considerados área enzoótica para a fasciolose bovina. Ultimamente, têm sido relatados novos casos em municípios antes considerados indenes, indicando novas áreas de transmissão e disseminação da fasciolose (Lima et al. 2009, Dracz & Lima 2014, Dracz 2016).

As infecções por *F. hepatica* dependem da presença de hospedeiros definitivos para dispersão dos ovos e de moluscos do gênero *Lymnaea* sp., hospedeiros intermediários que apresentam grande capacidade de colonização de novos ambientes quando introduzidas naturalmente ou artificialmente. Na medicina humana, a fasciolose normalmente acompanha a distribuição da doença nos animais, ocorrendo principalmente em áreas enzoóticas. A transmissão desse helminto está diretamente relacionada à ingestão de água, vegetação e verduras contaminadas com a forma infectante do parasito, as metacercárias.

A fasciolose pode manifestar-se sob as formas aguda, subclínica e crônica. A intensidade dos sinais clínicos varia de acordo com a espécie animal, raça, idade, estado nutricional, estado imunológico, infecções concomitantes, carga parasitária e fase de desenvolvimento do parasito. Entretanto, existem outros fatores que podem contribuir na patogênese dos animais, como condições climáticas, tipo de pastagem associado ao manejo e taxa de lotação (Mattos et al. 1997, Lima et al. 2009).

Devido às diversas interações que ocorre com o hospedeiro definitivo a infecção por *F. hepatica* pode causar mudanças na composição do sangue como:

nas contagens dos leucócitos totais e diferenciais, hemácias, concentrações das proteínas plasmáticas e hepáticas, imunoglobulinas, citocinas e dos minerais. O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento da fasciolose em ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados e observar os parâmetros parasitológicos, hematológicos e clínicos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Aspectos gerais da ovinocultura**

Os ovinos estão entre as primeiras espécies de animais domesticadas pelo homem por serem fonte de alimento, de lã, de leite, de tração e de proteção (couro), que eram de extrema importância para a sobrevivência humana (Bruna 2015). A ovinocultura, seja para fins econômicos ou de subsistência, é praticada no mundo inteiro e chega a, aproximadamente, um bilhão de animais, sendo a espécie com maior número de raças catalogadas, segundo dados da FAO (2013). A capacidade de adaptação a diferentes climas, relevos, vegetações, resultado do processo de domesticação e posterior seleção, é um dos fatores que possibilitaram esse sucesso de expansão a nível mundial (Bruna 2015).

Inicialmente, a ovinocultura no Brasil foi uma atividade econômica praticada no Sul do país e posteriormente, implementada e praticada como forma de subsistência nas regiões Norte e Nordeste do país. Porém, nos últimos anos, vários criadores e pecuaristas em todas as regiões brasileiras começaram a utilizar essa atividade como alternativa econômica viável e sustentável na diversificação da produção. Os investimentos que começaram a ocorrer na ovinocultura justificam-se pela boa receptividade que a carne de cordeiro tem tido em segmentos da alta gastronomia, além de ser fonte proteica para populações de baixa renda, principalmente nas regiões nordeste do Brasil e norte de Minas Gerais. No Brasil estima-se que o rebanho ovino seja da ordem de 18.410.551 milhões de animais, distribuídos em todo o território nacional e com maior concentração nas regiões Nordeste (11.149.336), Sul (4.877.671), Centro-oeste (1.027.552), Sudeste (700.336) e Norte (655.656), com características distintas em termos de raça e

sistema de criação (IBGE 2015). Minas Gerais possui 225.893 mil animais, sendo que ovinos da raça Santa Inês, oriunda do nordeste do Brasil, e seus cruzamentos predominam na maioria das criações no estado. Uma das limitações na exploração econômica da ovinocultura em todo o mundo são as helmintoses, gastrointestinais e hepática (Lima et al. 2009), destacando a fasciolose, assunto deste trabalho.

## **2.2 Histórico de *Fasciola hepatica***

Segundo Resende (1979), tem-se conhecimento da *F. hepatica* desde o século IX, com o relato da “doença do fígado de ovinos, no 1º Tratado de Saúde Animal do Mundo Árabe”.

Segundo Andrews (1999), Jean de Brie (1379) publicou um tratado realizado para o Rei da França, Charles V, sobre gestão e produção de lã em ovinos, quando mencionou a presença de doença hepática nos animais denominada, na época, de “doença do apodrecimento do fígado”, atualmente reconhecida como “*Black Disease*”. Ainda na mesma revisão, Andrews (1999) relatou que Francisco Redi encontrou parasitos no fígado de um ovino em 1668, época em que demonstrou a ocorrência de oviposição e realizou a primeira descrição morfológica da forma adulta.

Frank Nicholls (1755), por sua vez, também observou a “podridão do fígado” em bovinos, relatando ainda que os ductos biliares estavam bloqueados por “uma parede de pedra” em volta dos helmintos, como reconhecido nos textos atuais pelo fenômeno de calcificação. Este mesmo autor também descreve que a confirmação de *Lymnaea truncatula* como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* ocorreu simultaneamente na Inglaterra por Thomas (1882) e na Alemanha por Leuckart (1882). Segundo o mesmo autor, o desenvolvimento de *F. hepatica* no hospedeiro definitivo foi descrito em 1914 por Dimitry Sinitsin em coelhos.

## **2.3 Taxonomia**

Segundo Yamaguti (1961), a espécie *Fasciola hepatica* pertence ao Reino Animalia, Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda (Rudolphi, 1808), Sub-Classe Digenea (Van Beneden, 1858), Família Fasciolidae (Railliet, 1895), Sub-Família

Fasciolinae (Hassal, 1898), Gênero *Fasciola* (Linnaeus, 1758), Espécie *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).

## 2.4 Ciclo biológico

As formas adultas do parasito são encontradas nos ductos biliares e eliminam ovos não embrionados nas fezes dos hospedeiros definitivos. No ambiente, o ovo em contato com água, forma-se no seu interior a larva denominada miracídio, em um período de oito a 14 dias, dependendo dos fatores ambientais, como a temperatura, a luminosidade e a oxigenação (Ueta 1980). O miracídio eclode, se locomove ativamente com o auxílio das placas ciliadas, até encontrar o hospedeiro intermediário, os moluscos limneídeos, como os do gênero *Lymnaea*. O miracídio penetra nas partes moles do molusco, transforma-se em esporocisto, contendo no seu interior células germinativas que originam outra forma evolutiva, as rédias. As rédias apresentam abertura bucal, tubo digestivo primitivo, poro de nascimento e células germinativas que originam as cercárias. Dependendo das condições ambientais, poderá ocorrer segunda geração de rédias. As cercárias, quando formadas, saem de dentro da rédia pelo poro de nascimento, podendo alcançar o meio externo migrando pelo colar do manto. No ambiente aquático, as cercárias movimentam-se com ajuda de sua cauda até encontrar substrato para fixar-se. Após a fixação, a cercária, com as secreções das glândulas cistogênicas, transforma em metacercária, forma infectante para os hospedeiros definitivos. O período da penetração do miracídio no molusco até a eliminação das cercárias varia entre 50 a 60 dias. Os hospedeiros definitivos se infectam ao ingerirem vegetação ou água contendo as metacercárias. Após a ingestão, as metacercárias dessencistam-se no trato gastrointestinal e os parasitos jovens atravessam a parede do intestino delgado, alcançam a cavidade peritoneal e migram até atingirem o fígado. Após atravessar a cápsula hepática, os parasitos imaturos migram pelo parênquima hepático, onde se alimentam de tecidos, restos celulares e sangue. A partir de 45 dias atingem os ductos biliares, alcançando a maturidade. Os ovos começam a ser eliminados juntamente com as fezes em torno de 60-70 dias (Silva et al. 1994; Andrews 1999).

## 2.5 Epidemiologia

### 2.5.1 No Brasil

Na atividade pecuária brasileira, a expansão de *F. hepatica* ocorre de várias maneiras. Entretanto, alguns aspectos merecem atenção, como fatores ambientais, clima da região, índice pluviométrico, temperatura, tipo de relevo, tipo de vegetação e pastagens, e fatores econômicos como, a comercialização (exportação e importação) de animais sem fiscalização sanitária adequada, assim como o desconhecimento da fasciolose por técnicos e pecuaristas (Honer 1979, Serra-Freire et al. 1999, Lima et al. 2009).

No Brasil, diversos estudos têm sido realizados para avaliar a prevalência de *F. hepatica* em ruminantes (Silva et al. 1980, Ueno et al. 1982, Serra-Freire et al. 1995, Luz et al. 1992, Caldas et al. 1995, Faria et al. 2005, Lima et al. 2009, Dracz et al. 2014, 2016). O primeiro relato sobre *F. hepatica* foi feito por Lutz (1921), que encontrou o parasito em fígados de bovinos no município de Três Rios, estado do Rio de Janeiro. A partir de então, os estudos realizados, foram baseados principalmente na ocorrência e/ou prevalência da fasciolose em bovinos abatidos em frigoríficos.

Pêcego (1925) realizou um dos primeiros trabalhos no Brasil sobre a presença da *F. hepatica* em fígados de bovinos inspecionados em abatedouros no Rio Grande do Sul. Revelando uma variação nas taxas anuais de 1,9% a 21% de infecção pelo parasito, no período de 1918 e 1925. Mais tarde, Oliveira (1932) examinou 158.467 fígados de bovinos provenientes de 16 diferentes municípios do Rio Grande do Sul abatidos em frigorífico, revelando uma taxa de prevalência de 11,8%.

No Estado do Rio de Janeiro, Silva (1936), ao estudar a prevalência de *F. hepatica* em bovinos abatidos em matadouros municipais, verificou, em 866.180 bovinos abatidos no período de 1927 a 1935, taxa de infecção de 0,23% (Coelho 2001, Oliveira 2008).

Ribeiro (1949) avaliou condenações de carcaças e vísceras de bovinos em matadouros do Brasil Central, nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Goiás e zona do Triângulo Mineiro, relatando incidência de 2,9% e 3,4% para os anos de 1946 e 1947 (Dacal et al. 1988, Coelho 2001, Oliveira 2008).

Segundo Honer (1979) o problema da fasciolose no país, nessa época, tinha dois aspectos importantes: um com relação à dispersão, na região centro-sul, onde a fasciolose ocorria nas criações intensivas de gado de leite, e a outra na região sul, onde a doença estava presente em rebanhos de criações extensivas de gado de corte, sendo a região sul, a área que apresentava maior ocorrência no Brasil. Outra área que começou a chamar atenção foi a região sudeste, no Vale do Paraíba, estado de São Paulo.

Ueno et al. (1982), com o objetivo avaliar a importância econômica da fasciolose no estado do Rio Grande do Sul, utilizaram dados obtidos pelo Serviço de Inspeção Sanitária dos principais matadouros do estado e observaram que as taxas anuais de fígados condenados por fasciolose variaram entre 12-13% em bovinos e 7% em ovinos.

Santos et al. (2000), no município de Itajaí, estado do Rio de Janeiro, realizaram estudo helmintológico em animais explorados por pequenos produtores. No estudo, observou-se a presença de ovos de *F. hepatica* em 100% dos animais amostrados, como eqüinos, ovinos e caprinos, explorados em pastejo consorciado. Os autores relataram ser este o primeiro caso da fasciolose em eqüinos, ovinos e caprinos da Região Sudeste do Brasil.

Pile et al. (2001) estudaram, no município de Maricá, Rio de Janeiro, a presença de ovos de *F. hepatica* nas fezes de búfalos jovens e adultos utilizando a técnica de Quatro tamises, detectando índice de ocorrência de 2,5%.

Bernardo et al. (2011) avaliaram as perdas econômicas e a porcentagem de condenação devido a fasciolose no estado do Espírito Santo. Analisando dados oriundos de um matadouro localizado no município de Atílio Vivácqua, observaram que a prevalência de condenação aumentou consideravelmente, sendo de 15,24% em 2006, 23,93% em 2007, 28,57% em 2008 e de 28,24% em 2009, em um total de 110.956 bovinos abatidos nesse período.

Bennema et al. (2014) utilizaram dados georreferenciados da prevalência de *F. hepatica* em bovinos abatidos em 1.032 municípios do país, onde fígados foram condenados por causa do parasito pelo Serviço de Inspeção Federal (MAPA/SIF). Nesse estudo, em onze estados observou-se pelo menos um animal infectado: Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Entretanto,

a prevalência mais elevada da fasciolose foi observada nos estados do Sul, com presença de focos da doença ao longo do litoral do Paraná e Santa Catarina e no Rio Grande do Sul.

### **2.5.2 Minas Gerais**

No estado de Minas Gerais o primeiro bovino infectado por *F. hepatica* foi necropsiado por Carvalho (1940) em Viçosa, região da zona da mata.

Dacal (1979) realizou um estudo no sudeste do Brasil, identificando parasitismo por *F. hepatica* em rebanhos comerciais e em moluscos do gênero *Lymnaea*, sugerindo que a população humana, os rebanhos bovinos, ovinos e suínos de Minas Gerais, particularmente, aqueles próximos do Vale do Rio Paraíba, estavam sujeitos à infecção pelo parasito.

Caldas et al. (1995) realizaram um estudo no estado de Minas Gerais de 51 municípios pertencentes a seis mesorregiões, por meio de exames coproparasitológicos de 3086 bovinos distribuídos em 205 propriedades rurais. Observaram prevalência de 1,49% de *F. hepatica* para as seis mesorregiões de Minas Gerais, sendo as prevalências distribuídas em Belo Horizonte (1,80%), Itabira (0,6%), Divinópolis (1,3%), Itajubá (9,05%), Poços de Caldas (0,26%) e Varginha (0,51%).

Faria et al. (2000) realizaram um estudo no município de Itajubá, e também observaram uma das maiores taxas de prevalência do estado, sendo que, das propriedades estudadas, 47,9%, apresentavam, pelo menos, um animal parasitado. Os resultados dos exames coproparasitológicos dos rebanhos leiteiros do município apresentaram prevalência entre 9 e 13% dos bovinos positivos para *F. hepatica*.

Coelho et al. (2003), estudando a dinâmica da infecção no hospedeiro intermediário também em Itajubá, encontraram 1,92% moluscos *Lymnaea columella* infectados naturalmente por diferentes estádios evolutivos de *F. hepatica*. Coelho et al. (2003), estudando a variação populacional de *L. columella* e sua taxa de infecção natural por *F. hepatica* no município de Itajubá, observou que a população de moluscos aumentava de junho a novembro e decrescia de dezembro a fevereiro.

Faria et al. (2005), também em Itajubá, estudaram a flutuação na prevalência da fasciolose em animais cruzados durante 12 meses e observaram que os animais

apresentavam ovos de *F. hepatica* durante o ano inteiro, e a maior postura de ovos ocorreu entre os meses de março e outubro.

Lima et al. (2009) demonstraram a prevalência da fasciolose hepática em bovinos de 16 municípios de Minas Gerais, sendo que as cidades que apresentaram maiores índices foram de Itajubá (70%), Piranguinho, Cachoeira de Minas (40%), Careaçú e Brasópolis (30%). Ainda no mesmo trabalho, os autores coletaram moluscos da espécie *Lymnaea columella* nos municípios, mas, apenas em Itajubá, encontrou-se infecção com taxa de infecção 2.96%. Tais achados indicam a possibilidade do surgimento de novas áreas de transmissão e disseminação da fasciolose.

Dracz & Lima (2014) avaliaram a ocorrência da *F. hepatica* em fezes de bovinos e búfalos provenientes dos municípios de São José da Lapa e Pedro Leopoldo, observando ocorrência de 18,75% para bovinos e 28,73% para bubalinos. Esse foi o primeiro trabalho a relatar a infecção natural de búfalos no estado de Minas Gerais.

## **2.6 Patogenia da fasciolose ovina**

As lesões causadas por *F. hepatica* em fígados de ovinos vêm sendo relatadas por vários autores (Sinclair 1962, Boray 1967, Dow et al. 1968, Presidente 1975, Rushton & Murray 1977, Dargie 1987, Chauvin 1995, Bostelmann et al. 2000, Mekroud et al. 2007, Rojas et al. 2015).

Kendall & Parfitt (1962) observaram, em estudos com ovinos, que os estágios imaturos migravam através da parede intestinal, rompendo camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa, chegando à cavidade peritoneal em 72 horas. Após os estágios imaturos entrarem na cavidade abdominal, continuam migrando entre vários órgãos, chegando ao fígado aproximadamente 90 horas após a infecção.

Após a chegada ao parênquima hepático, os estágios imaturos penetram na cápsula hepática, dando início ao processo de migração, que ocorre de 15 a 45 dias. As migrações dos estágios imaturos pelo fígado caracterizam a fase aguda da doença, com destruição do parênquima hepático, dos vasos sanguíneos, dos ductos biliares, provocando micro hemorragias e trombose. As lesões hepáticas aumentam de acordo com o desenvolvimento dos parasitos, da abrasão causada pelos

espinhos presentes no tegumento, da ação mecânica das ventosas oral e ventral e da liberação de proteases, bem como a suscetibilidade do hospedeiro.

Os estágios imaturos e adultos, ao longo do ciclo biológico produzem e liberam grandes quantidades de moléculas denominadas de produtos de excreção/secreção (ES). Esses produtos contêm enzimas, que auxiliam na progressão do parasito pelo intestino e parênquima hepático, na destruição das proteínas intersticiais da matriz, como a fibronectina, a laminina e o colágeno, na aquisição de nutrientes por catabolização das proteínas do hospedeiro em peptídeos absorvíveis, na modulação do sistema imune do hospedeiro por clivagem das imunoglobulinas, redução da atividade dos linfócitos, ativação da via alternativa dos macrófagos e indução de apoptose (Dixit et al. 2008, Cancela 2008; Escamilla et al. 2016).

No trajeto percorrido pelos estágios imaturos, já foram encontrados restos celulares, eritrócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Os casos de morte do hospedeiro na fase aguda são devido às consequências das migrações hepáticas realizadas pelos estágios imaturos, que comprometem a integridade do fígado e causam alterações na composição do sangue dos hospedeiros, principalmente nos eritrócitos, nos leucócitos e componentes, como as proteínas plasmáticas, proteínas hepáticas e minerais (Sinclair 1967, Boray 1967, Rushton & Murray 1977, Dargie 1987, Chauvin 1995, Behm & Sangster 1999, Haçariz et al. 2009 Rojas et al. 2015.).

Nos ductos biliares, os estágios imaturos começam a ingerir sangue e transformam-se em parasitos adultos, caracterizando a fase crônica da doença. Enquanto o parênquima hepático recupera-se do processo inflamatório, o epitélio dos ductos biliares, hepáticos e áreas adjacentes tornam-se inflamados (Sinclair 1967). Nessa fase, a anemia torna-se acentuada devido à intensa espoliação sanguínea, sendo um dos fatores relacionados à mortalidade do hospedeiro. Os parasitos adultos provocam descamação e ulceração dos ductos biliares e, como resposta à irritação mecânica, o organismo modifica a sua estrutura, tornando a parede dos ductos espessada e hiperplásica resultando numa colangiohepatite (Sinclair 1967, Dow et al. 1968, Rushton & Murray 1977, Bostelmann et al. 2000). Isso ocorre devido à infiltração de fibroblastos, que são diretamente responsáveis pelos processos de fibrose ocorridos no fígado. A hiperplasia dos ductos biliares

acentua-se com o decorrer da infecção, atingindo níveis extremos, levando à necrose desses ductos e ao quadro de hemorragia (Sinclair 1967; Boray 1967, Dow et al., 1968, Rushton & Murray 1977, Behm & Sangster 1999). Além disso, a presença dos parasitos nos ductos biliares pode interferir na secreção e drenagem da bile para o intestino, podendo provocar alteração da absorção de nutrientes. A fibrose no fígado torna-se grave em infecções mais intensas ou prolongadas, sendo mais marcante em bovinos quando comparado aos ovinos (Dawes & Hughes 1964, Ross et al., 1966, Boray 1969, Rushton & Murray 1977).

Os mecanismos envolvidos nas respostas do hospedeiro e as estratégias de sobrevivência do parasito mostram-se bastante complexos. A patogênese da fasciolose pode ser compreendida a partir da ingestão das metacercárias, com densencistamento no intestino delgado, onde ocorre a primeira interação entre o parasito e os tecidos do hospedeiro definitivo, sendo diretamente associada à espécie de hospedeiro, à carga parasitária resultante e às características bioquímicas do parasito durante os diferentes estágios de seu desenvolvimento (Sinclair 1967, Boray 1967, Rushton & Murray 1977, Dargie 1987, Behm & Sangster 1999).

## **2.7 Sinais clínicos nos ovinos**

A evolução clínica da fasciolose é muito variável e depende da espécie de *Fasciola* envolvida na infecção, da carga parasitária, da resposta imune do hospedeiro, da fase e da duração da infecção, entre outros (Boray 1967, Hawkins & Morris 1978, Haroun & Hillyer 1986, Behm & Sangster 1999, Rojo-Vázquez et al. 2012).

Sinclair (1962), com o objetivo de avaliar alguns aspectos da patologia clínica da fasciolose, infectou oito borregos da raça Cross-Kerry com 10 meses de idade e dois grupos foram formados. O grupo A recebeu 600 metacercárias em dose única e o grupo B recebeu quatro doses de 150 metacercárias semanalmente. Os animais infectados apresentaram redução do apetite aos 7 dpi; aos 30 dpi ficaram prostrados, houve redução na ruminação e na produção de fezes, além de

olidipsia; aos 90 dpi apresentaram mucosas pálidas, fraqueza muscular, cabeça baixa, pelagem opaca, presença de edema submandibular e ascite.

Boray (1967), para estudar os aspectos clínicos em ovinos, infectou 148 animais da raça Merino por *F. hepatica*. As doses de metacercárias variaram de 200 a 10.000. Observou-se que os ovinos infectados com 200 metacercárias não apresentaram sinais clínicos e ganharam 5 kg em 175 dias de estudo. Os ovinos que receberam 500 metacercárias apresentaram ligeira inapetência nas duas primeiras semanas após a infecção; no entanto, ganharam 4,68 kg nos primeiros 84 dias de estudo. Dos 15 ovinos infectados com 500 metacercárias, 10 apresentaram anemia progressiva aos 105 dpi, morrendo ou sendo sacrificados entre os 168 a 273 dpi. As infecções com 1.000 a 2.000 metacercárias causaram inapetência temporária, perda de peso entre os 14 e 28 dpi, seguidos de algum ganho entre os 49 e 56 dpi; porém, após esse intervalo, os ovinos perderam peso gradualmente. Alguns ovinos entre os 56 e 70 dpi apresentaram constipação, ascite e dor abdominal, além das mucosas oculares apresentarem-se com coloração amarelo-avermelhada. No entanto, alguns ovinos melhoravam a condição física entre os 70 e 91 dpi, mas, aos 98 dpi, alguns ovinos apresentavam mucosa ocular pálida, perda de 7 kg de peso, lã opaca que se desprendia com facilidade, ascite grave e morte, registrada entre os 112 e 182 dpi. As infecções com 4.000 a 10.000 metacercárias causaram, em todos os ovinos, aos 14 dpi, inapetência, aos 21 dpi, perda de peso, entre os 35 e 42 dpi, anemia progressiva. A morte de dois ovinos, um infectado com 4.000 metacercárias e o outro com 6.000, ocorreu entre 28 e 35 dpi. Aos 56 dpi, dor abdominal e ascite, mucosa ocular com coloração amarelo-esbranquiçada, fezes ressecadas, além de alguns perderem em média 9 kg de peso antes de morrer, sendo que a perda máxima chegou a 18 kg. Os ovinos infectados com 100 a 1.000 metacercárias morreram de fasciolose crônica, os ovinos que receberam carga parasitária superior a essa, morreram da forma aguda ou subaguda. Os sinais clínicos observados nos ovinos infectados com 200 a 700 metacercárias foram atribuídos à anemia progressiva e crônica observada aos 91 dpi. No entanto, nos ovinos que receberam 1.000 metacercárias ou carga superior, os sinais clínicos foram relacionados à anemia devido à hemorragia em múltiplas áreas do parênquima hepático, provocada pela migração dos estágios imaturos, e à intensa reparação do tecido hepático, o

que pode ter prolongando a migração no parênquima hepático e, conseqüentemente, aumentando ainda mais as lesões no fígado.

Presidente et al. (1975) infectaram seis borregos mestiços (Cheviot X Lester), de seis meses de idade, com carga parasitária variando de 100, 500 e 2.500 metacercárias de *F. hepatica* e relataram que apenas um ovino infectado com 2.500 metacercárias apresentou, durante o estudo, distensão abdominal, mucosas pálidas e perda de peso, morrendo aos 105 dpi.

Sinclair (1975) infectou 16 ovinos da raça Clun com 18 meses de idade, e observou que os ovinos que receberam 1.000 metacercárias de *F. hepatica* apresentaram, aos 42 dpi, inapetência e desconforto abdominal; aos 56 dpi, ocorreu perda da condição corporal; e, aos 91 dpi, perderam 2kg de peso médio. Sugeriu que a inapetência poderia estar relacionada à falha na síntese de proteína ou devido à perda de proteína plasmática, pois ocorreu hipoalbumemia.

Berry & Dargie (1976) observaram que os ovinos da raça Blackface com fasciolose apresentavam sinais clínicos, como inapetência, perda de peso, fraqueza, palidez das mucosas e na maioria dos casos edema submandibular.

Dargie (1987) associou a falta de apetite nos ovinos infectados à presença dos parasitos adultos nos ductos biliares, que aparece apenas durante a primeira fase da infecção aguda grave.

Na fasciolose, encontram-se duas formas de manifestações clínicas bem caracterizadas. A fase aguda, onde os sinais clínicos característicos são dor abdominal, perda de peso, anemia, hepatomegalia e febre, resultado das lesões causadas pela migração dos helmintos imaturos através do parênquima hepático (Sinclair 1962, Boray 1967, Rushton & Murray 1977, Rojo-Vázquez et al. 2012). Nos casos de alta carga parasitária, os estágios imaturos podem causar a morte súbita na fase aguda por hepatite traumática (Boray 1967). Ainda na fase aguda, Rojo-Vázquez et al. (2012) sugerem que a observação minuciosa do rebanho de ovinos permite a identificação de outros sinais clínicos, como mucosas pálidas, letargia e dispnéia quando em movimento, fígado palpável e ascite. Em alguns casos durante a fase aguda, podem ser evidenciadas perdas de até 25% de um rebanho quando ocorre surtos (Behm & Sangster 1999). A fase aguda, associada à morte e hepatite no rebanho de ovinos, deve-se à ingestão de grande número de metacercárias em um curto período de tempo, segundo Rojo-Vázquez et al. (2012). Admite-se que o

maior grau de infecção dos ovinos deve-se a muitos fatores, como os seus hábitos alimentares, uma vez que estes se alimentam das porções mais baixas da vegetação, onde há maior concentração de metacercárias, ao contrário dos bovinos que ingerem a porção mais alta da vegetação.

A fase crônica, por sua vez, é caracterizada pela presença dos parasitos adultos nos ductos biliares, onde induzem colangite, hiperplasia do epitélio e extensas áreas de fibrose (Rushton & Murray 1977, Behm Sangster 1999, Rojo-Vázquez et al. 2012). Na Europa, a fasciolose crônica é a forma mais comum da doença. A infecção ocorre especialmente no outono e inverno, quatro a cinco meses após a ingestão de número baixo/moderado de metacercárias. Nestes estudos, relataram ainda, que a infecção é mais grave em animais desnutridos ou quando as exigências nutricionais são elevadas, como no final da gravidez ou início da lactação, onde ocorre perda progressiva da condição corporal (Rojo-Vázquez et al. 2012). A fasciolose crônica é caracterizada por perda de peso, ascite, desenvolvimento gradual de edema submandibular, anemia, hipoproteïnemia, hipoalbuminemia, elevada atividade enzimática no fígado, eosinofilia e, em cargas parasitárias muito altas, a infecção pode levar o animal à morte (Behm & Sangster 1999).

Há também a infecção subclínica, com grande importância devido à dificuldade de se diagnosticar e por causar várias perdas econômicas (Boray 1967, Sinclair 1972, Berry & Dargie 1976, Hawkins & Morris 1978, Sykes et al. 1980, Dargie 1987). No entanto, a caracterização das fases da doença em fasciolose aguda, subclínica e crônica é pouco aplicável na prática, pois diferentes fatores afetam a evolução dos sinais clínicos da infecção (Rojo-Vázquez et al. 2012). A manifestação da fasciolose subclínica ocorre de seis a 10 semanas após a ingestão das metacercárias; em casos fatais, quando presentes, são evidenciados sinais clínicos uma a duas semanas antes do óbito, tais como letargia, perda de condição corporal, mucosas pálidas e fígado palpável (Boray 1967, Sinclair 1975, Berry & Dargie 1976, Hawkins & Morris 1978, Sykes et al. 1980, Dargie 1987). A doença subclínica é caracterizada por anemia devido à hemorragia hepática ser mais prolongada do que na doença aguda (Rojo-Vázquez et al. 2012). O grau de anorexia tem sido associado com a intensidade da infecção, mas não há nenhuma relação clara entre a carga parasitária e a redução do apetite (Symons 1985, Dargie 1987).

No entanto Ferre et al. (1994) relataram que infecções com apenas 20 parasitos adultos poderiam causar grande redução na ingestão voluntária de alimentos em cordeiros. Contudo, Anil e Forbes (1980) e Ferre et al. (1994, 1995) atribuíram que a redução do apetite poderia estar relacionada à função hepática comprometida, devido ao aumento das concentrações plasmáticas de ácidos biliares e à redução no fluxo da bile, que contribuíram para as lesões no fígado e conduziram à redução no metabolismo de glicolipídico.

O comportamento clínico também varia com o tipo de hospedeiro, apresentando-se a fasciolose de forma bastante distinta. Em situações a campo, os animais estão em constante contato com o parasito, resultando em sintomas de fase aguda e crônica associados. A infecção hepática pode ser altamente patogênica, levando à severa morbidade e à mortalidade dos hospedeiros (Boray 1967). Os ovinos mostram-se susceptíveis, não adquirem resistência, a mortalidade ocorre tanto na fase aguda quanto na crônica e encontra-se associada a altas cargas parasitárias, ocasionando anemia severa, perda das funções do tecido e, em alguns casos hemorragia em outros tecidos (Boray 1967).

## **2.8 Diagnóstico**

### **2.8.1 Diagnóstico parasitológico**

Diversos autores, entre eles Dennis et al., (1954), Taylor (1964), Happich & Boray (1969) e Bendezu & Landa (1973), preconizam o exame coprológico como a forma mais segura para o diagnóstico da fasciolose crônica. O exame coprológico determina a presença de ovos de *Fasciola* spp., o que indica a existência de trematódeo adulto nos ductos biliares.

Várias técnicas para o diagnóstico coprológico da fasciolose encontram-se descritas na literatura. Segundo Girão & Ueno (1985), no diagnóstico parasitológico a detecção de ovos nas fezes pode ser feita utilizando-se a técnica de processamento pela filtração sequencial em dois tamises, “Flukefinder”, ou a técnica de Quatro Tamises Metálicos modificada. Os autores observaram que a pipeta usada para retirar o excesso de água na placa de petri, resultante da lavagem do

tamis ao recolher o sedimento, reteve aproximadamente 3% dos ovos de *F. hepatica* e o tamis de 200 malhas/polegada 4,9%.

Abidu et al. (1996), com objetivo de diagnosticar fasciolose hepática em ruminantes através de estudo comparativo entre a técnica de Girão & Ueno ou técnica dos quatro tamises com filtro de Visser e “flukefinder”, observaram convergência nos resultados, mas concluíram que tais técnicas poderiam ser utilizadas como rotina no diagnóstico da fasciolose.

Faria et al. (2008), com o objetivo de avaliar o grau de concordância entre as técnicas de quatro tamises e de filtração sequencial utilizando 1076 amostras de fezes de bovinos, observaram que ambas as técnicas possuem 92,7% sensibilidade e 94,9% de especificidade, sendo as duas técnicas apropriadas para a detecção de ovos de *F. hepatica*. No entanto, a técnica de quatro tamises é de fácil realização, pois o material necessário para os exames são de fácil obtenção, baixo custo de confecção e de manutenção dos tamises.

Na escolha da técnica empregada para detecção de ovos de *F. hepatica*, a eficiência é fator importante, devido à necessidade de resultados confiáveis. Entretanto, a operacionalização deve ser levada em consideração, na tentativa de reduzir os custos, o tempo empregado na elaboração dos exames, sem que isso afete a qualidade dos resultados (Faria et al. 2008).

### **2.8.2 Diagnóstico clínico**

O diagnóstico clínico deve basear-se em vários fatores e não somente nos sinais clínicos apresentados pelo animal, pois muitos animais apresentam a doença de forma subclínica. Os sinais clínicos podem variar, dependendo da carga parasitária, da fase de desenvolvimento dos parasitos e da espécie de hospedeiro envolvido. Mesmo assim quando os sinais clínicos são evidenciados, não são sinais patognomônicos, mas apesar disso, são sinais que levam o veterinário a suspeitar da fasciolose (Urquart et al. 1996, Faria et al. 2005, Lima et al. 2009).

Segundo Rojo-Vazquez et al. (2012), na forma aguda da fasciolose, os ovinos podem apresentar mucosas hipocrômicas, atividade de pastejo diminuída, relutantes em movimentar-se e podem ocorrer mortes súbitas de animais que aparentemente estavam saudáveis. Na fasciolose subclínica, apesar das lesões no fígado, os ovinos

podem não apresentar sinais clínicos evidentes, mas quando observados geralmente são de baixa condição corporal, baixa qualidade da lã e mucosas hipocrômicas.

A fasciolose crônica é caracterizada por perda progressiva da condição corporal, emaciação e edemas em algumas partes do corpo, especialmente na região do abdômen e submandibular. Segundo Rojo-Vazquez et al. (2012), na Europa, além das mucosas hipocrômicas, algumas mortes podem ser observadas, especialmente quando a infecção ocorre em momentos como a prenhez ou a lactação.

Os sinais clínicos na fase crônica são mais evidentes, os animais podem apresentar emaciação, anorexia, perda de peso, desidratação, icterícia, edema e/ou ascite, mucosas hipocrômicas, pelo seco e quebradiço, constipação ou diarreia, distúrbios digestivos e morte em condições de intenso parasitismo, especialmente em animais jovens (Sinclair 1962, Boray 1969, Murray & Rushton 1977, Sykes et al. 1980, Ferre et al. (1995), Rojo-Vazquez et al. 2012).

#### 2.8.2.1 *Famacha*

O nome do método é decorrente das iniciais do seu idealizador, o Dr. François Malan. Malan & Van Wyk (1992) associaram a incidência do *Haemonchus contortus* com o hematócrito e correlacionaram os valores do hematócrito com diferentes colorações de conjuntiva. Com o auxílio da computação gráfica, a partir da fotografia da mucosa ocular de vários animais, foram estabelecidos 5 graus de anemia apresentando correlação de 0,8 e confiabilidade de 95% nas infecções por *H. contortus* (Malan et al. 2001). As diferentes colorações de conjuntiva, correspondentes à classificação de 1 a 5 no grau de anemia, variam entre vermelho, rosa-vermelho, rosa, rosa-pálido e branco. Olah et. al. (2015), utilizando estes parâmetros, avaliaram o potencial do método de Famacha<sup>©</sup> em prever a existência de outros parasitos hematófagos, especificamente a *F. hepatica* em ovinos. Os resultados obtidos revelaram que o método Famacha<sup>©</sup> pode ser usado para identificar os ovinos com elevada carga parasitária. Apesar da forte correlação, o escore Famacha<sup>©</sup> e a carga parasitária são variáveis que correlacionaram moderadamente com hematócrito.

### 2.8.2.2 *Escore de condição corporal*

Machado et al. (2008) relataram que Jefferies (1961), na Escócia, foi quem idealizou o método de avaliação da condição corporal para ovinos, baseado na escala de 0 a 5 pontos, o escore de condição corporal variando de muito magra a muito gorda. Avaliação da condição corporal é medida subjetiva de avaliar o estado nutricional dos ruminantes por meio da classificação dos animais em função da cobertura muscular e da massa de gordura. Portanto, o escore de condição corporal (ECC) é realizado por meio de avaliação visual e/ou tátil, representando uma ferramenta importante de manejo. O método é rápido, prático e barato, reflete as reservas energéticas dos animais e auxilia na indicação de práticas a serem adotadas no manejo nutricional do rebanho. Há diferentes escalas de escores, as quais variam no conceito, nos pontos de observação e na espécie animal à qual são aplicados. As notas são dadas aos animais de acordo com a quantidade de reservas teciduais, especialmente de gordura e de músculos, em determinadas regiões do corpo, frequentemente associadas a marcos anatômicos específicos, tais como determinadas protuberâncias ósseas: costelas, processos espinhosos da coluna vertebral, processos transversos da coluna vertebral, vazão, ponta do íleo, base da cauda, sacro e vértebras lombares. Os escores extremos, superior ou inferior, são indesejáveis em qualquer escala e em qualquer espécie animal avaliado (Rosemberg 1993).

### 2.8.2.3 *Ganho de peso*

Segundo Diiwel et al., ( 1972) apenas 38 parasitos adultos são capazes de causar perda de peso em ovinos parasitados por *F. hepatica*. Berry & Dargie (1976) realizaram estudo com ovinos experimentalmente infectados com *F. hepatica*, relatando que o ganho de peso pode ser reduzido significativamente em ovinos infectados com 45 parasitos adultos. Vários estudos têm mostrado que altas cargas parasitárias, por exemplo acima de 350 vermes, podem causar grave perda de peso e morte em ovinos adultos (Sinclair 1962, Boray 1969, Berry & Dargie 1976, Hawkins & Morris 1978, Hawkins 1984).

A perda de peso ocasionada por *F. hepatica* tem várias etiologias distintas, por exemplo, o aumento dos níveis de ureia plasmática, indicando que a desaminação de aminoácidos é aumentada dentro do intestino, coincidindo com o aumento dos níveis de ureia no sangue, a hipertrofia hepática, em consequência da migração dos estágios imaturos pelo parênquima hepático, e a ingestão de proteínas pelos parasitos adultos (Berry & Dargie 1976, Sykes et al. 1980).

A outra hipótese seria devido ao aumento na demanda de proteína pelo desvio fisiológico de aminoácidos para atender aos requisitos de síntese de proteínas no fígado, na medula óssea, no tecido linfóide decorrentes das estimulações antigênicas e na passagem de proteínas do sangue para o intestino, reduzindo a disponibilidade de aminoácidos para crescimento, ganho de peso, lã e leite (Darge et al. 1979).

O ganho de peso reduzido em ovinos tem duas causas aparentes: conversão alimentar reduzida e anorexia (inapetência). Ovinos infectados com menos de 200 helmintos adultos não apresentaram anorexia significativa (Sinclair 1975, Berry & Dargie 1976, Hawkins & Morris 1978, Dargie et al. 1979, Sykes et al. 1980, Ferre et al. 1994), indicando que o ganho de peso, reduzido nessa fase da infecção é comprometida devido à conversão alimentar. Em infecções experimentais com dose única em ovinos, a anorexia coincidiu com a entrada nos ductos biliares entre 42 e 49 dpi (Berry & Dargie de 1976, Dargie et al. 1979, Sykes et al. 1980, Ferre et al. 1994).

Raadsma et al. (2007) mostraram que durante o período experimental todos os borregos infectados e controles ganharam peso em consequência da alimentação ser *ad libitum* e estarem em fase de crescimento. No entanto, quando comparou o ganho de peso dos borregos infectados em relação aos controles, verificaram perda de 1,5 Kg em média dos infectados aos 7 dpi e redução significativa aos 14 dpi, sendo que o rebanho foi incapaz de recuperar peso compensatório durante o estudo em relação aos controles.

#### 2.8.2.4 Influência da fasciolose no perfil hematológico de ovinos

Os valores hematológicos são amplamente utilizados como valores de referência para a espécie. No entanto, animais de diferentes raças, idades, sexo,

estado fisiológico (lactação, prenhez, reprodução) e local de criação possuem necessidades nutricionais, energéticas e metabólicas diversas. Além desses fatores, as helmintoses também podem influenciar nesses valores (Ferreira Neto et al. 1977).

O hemograma é um exame complementar, que fornece ao profissional várias informações sobre o estado de saúde dos animais. Por essa técnica pode-se avaliar a resposta do sistema hematopoiético, diagnosticar doenças hematológicas, avaliar a evolução clínica provocadas em certas doenças, bem como as deficiências nutricionais, sendo este o motivo pelo qual o exame de sangue é o mais solicitado na rotina clínica, devido à sua praticidade e utilidade na prática clínica. No entanto, a anamnese e o exame clínico são essenciais para a interpretação dos dados hematológicos (Rosemberg 1993).

O hemograma é dividido em duas partes: o eritrograma, que compreende o número total de hemácias, hematócrito, concentração de hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), CHM (concentração de hemoglobina média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), e o leucograma, que avalia as contagens de leucócitos totais e diferenciais (Ferreira Neto et al. 1977).

A anemia é definida pela redução do número de hemácia, de hemoglobina ou do hematócrito abaixo dos valores de referência para a espécie. Constitui-se raramente como uma doença primária, necessitando conhecer a etiologia da anemia para que o tratamento racional seja empregado, pois ele não é direcionado somente para anemia, exceto como medida de emergência (Ferreira Neto et al. 1977).

Jennings et al. (1955) observaram que cada *F. hepatica* poderia ingerir 0,2 mL de sangue do hospedeiro durante o período de 24 horas. Um ovino pesando 20 Kg e infectado com 200 metacercárias de *F. hepatica*, pode perder 4 mL de sangue por dia e desenvolver algum tipo de anemia.

Alguns pesquisadores como Sinclair 1962, Boray 1967, Presidente et al. 1975, Berry & Dargie, 1976, estudaram a anemia em modelos experimentais e verificaram que anemia é um sinal clínico marcante dos animais parasitados por *F. hepatica*.

Dargie et al. (1979) atribuíram a anemia na fase inicial à hemorragia intra-hepática, devido à migração dos estágios imaturos pelo parênquima hepático.

Sykes et al. (1980) também encontraram significativa redução dos eritrócitos e hemoglobina em conjunto com maior MCV durante a fasciolose crônica subclínica em ovinos, em comparação com ovinos não infectados.

Hawkins (1984) sugeriu que a hemoglobina e o hematócrito podem ser utilizados na previsão da carga parasitária e para indicar a probabilidade de morte ou sobrevivência dos ovinos infectados. Ao final do estudo, concluiu que a morte poderia ocorrer em ovinos infectados quando o hematócrito fosse inferior a 15%.

Em contrapartida, Mekroud et al. (2007), trabalhando com 10 borregas do cruzamento entre Ouled – Djellal x New Zealand de quatro meses de idade e infectadas experimentalmente com 150 metacercárias de *F. hepatica*, relataram que, durante os 140 dias de estudo, não observaram variação no número de hemácias dos ovinos infectados em comparação as cinco borregas não infectadas.

Martinez-Pérez et al. (2014) relataram que os ovinos infectados com 200 metacercárias de *F. hepatica* reduziram o número de hemácias e hematócrito aos 14 dpi e observou que, aos 84 dpi, o número voltou a aumentar.

Raadsma et al. (2007), avaliando a resposta imune de borregos infectados, relataram que o hematócrito durante os 70 dias de estudo foi inferior ao verificado nos borregos não infectados, e que, aos 63 dpi, observaram queda significativa no hematócrito dos borregos infectados, 26%, enquanto os borregos não infectados apresentavam hematócrito acima de 30%.

#### 2.8.2.5 Leucograma

Tem sido bem documentado que a infecção de ovinos por *F. hepatica* induz aumento nas contagens médias dos leucócitos totais na circulação e migração de grande quantidade leucócitos do sangue para o fígado, especialmente de eosinófilos (Sinclair 1962, Boray 1967, Dow et al. 1968, Rushton & Murray 1977, Sykes et al. 1980, Chauvin et al. 1995, Zhang et al. 2005, Haçariz et al. 2009, Rojas et al. 2015).

No caso da fasciolose em ovinos, o aumento do número de eosinófilos no sangue está associado a dois momentos distintos da infecção. O primeiro quando os estágios imaturos estão migrando no parênquima hepático e o segundo quando os parasitos começam a entrar nos ductos biliares (Chauvin et. 1995, Raadsma et al. 2007). No entanto, a redução do número de eosinófilos no sangue periférico de

ovinos infectados pode ser devido à migração dos eosinófilos para o fígado, em consequência das lesões causadas pelos estágios imaturos (Ruston & Murray 1977).

Presidente et al. (1975) relataram que os borregos infectados aumentaram o número médio de eosinófilos a partir dos 14 dpi; também observaram dois picos nos números médios de eosinófilos, o primeiro aos 28 dpi e o segundo aos 42 dpi.

Sinclair (1975) observou que o número médio de eosinófilos nos ovinos infectados começou a aumentar aos 14 dpi e relatou o primeiro pico entre 56 e 70 dpi.

Ruston & Murray (1977) em estudo com ovinos infectados com 400 metacercárias de *F. hepatica* mostraram que, nas lesões encontradas nos fígados dos ovinos, a célula predominante é eosinófilo.

Chauvin et al. (1995), com objetivo de avaliar a resposta celular e humoral em ovinos originados do cruzamento entre Vendeen x Belle Islois infectados com 150 metacercárias de *F. hepatica*, observaram que o número de eosinófilos no sangue periférico começou a aumentar aos 14 dpi, apresentando pico aos 21 dpi.

Widjajanti et al. (2002) observaram correlação positiva entre o número de eosinófilos e o número de parasitos recuperados no fígado.

Zhang et al. (2005) observaram aumento bifásico com o primeiro pico nos números médios dos eosinófilos em ovinos infectados com 250 metacercárias de *F. hepatica* aos 28 dpi e o segundo pico entre 63 e 70 dpi.

Şimşek et al. (2006) demonstraram que a eosinofilia pode sugerir a presença de infecção provocada por helminto, mas a ausência de eosinofilia não pode excluir a presença desses parasitos.

Raadsma et al. (2007) relataram aumento bifásico de eosinófilos em borregos infectados, sendo o primeiro pico aos 28 dpi, seguido de redução aos 42 dpi e posterior pico aos 63 dpi em relação aos borregos não infectados.

Mekroud et al. (2007) observaram que borregas de raça mestiça (Ouled-Djellbal x New Zealand) infectados com 150 metacercárias de *F. hepatica* apresentaram aumento bifásico no número de eosinófilos, o primeiro aos 35 dpi e o segundo aos 91dpi.

Rojas et al. (2015) relataram a infiltração leucocitária no fígado de ovinos infectados com 180 metacercárias de *F. hepatica*, com predomínio de eosinófilos, mas também observou-se macrófagos, neutrófilos e linfócitos.

### 3 JUSTIFICATIVA

A fasciolose causada por *Fasciola hepatica* é uma zoonose, com distribuição cosmopolita e representa grande importância econômica na criação de ruminantes, especialmente em ovinos, devido perda de peso, queda na produção de leite, de carne, de lã e devido a abortos e gastos com tratamento. Os ovinos parasitados não apresentam sinais patognomônicos de fasciolose, podendo os sinais, serem confundidos com os de outras doenças, incluindo as infecções subclínicas.

Essa helmintose tem sido descrita em todas as regiões brasileiras e, em Minas Gerais, têm ocorrido, nos últimos anos, relatos de encontros de hospedeiros definitivos como, bovinos, bubalinos, capivaras e hospedeiros intermediários, como a *Lymnaea* (= *Pseudosuccinea*) *columella* infectados por *F. hepatica*. Em situações a campo, em áreas enzoóticas, os animais estão constantemente expostos à infecção e seus estágios evolutivos são encontrados no fígado, podendo levar a grave morbidade e mortalidade dos hospedeiros.

O desconhecimento da doença pelos técnicos e criadores, além da dificuldade de diagnóstico tanto parasitológico quanto clínico, são fatores que contribuem para a expansão do parasito. A ovinocultura apresenta um momento particular no Brasil, com diversificação de subprodutos, importação de animais e produção orgânica. A raça de ovinos Santa Inês, originária no nordeste do Brasil, apresenta características específicas, como a boa adaptação às condições tropicais e subtropicais, o que a torna importante zootecnicamente. Deve-se salientar que um dos fatores que interfere na exploração econômica dos ovinos são as helmintoses gastrintestinais e a fasciolose. No entanto, existem poucos trabalhos sobre o comportamento dos ovinos da raça Santa Inês infectados com *F. hepatica*, o que foi objetivo deste trabalho.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivos gerais**

Observar aspectos parasitológicos, clínicos e hematológicos em ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados por *F. hepatica*.

### **4.2 Objetivos específicos**

- a) Acompanhar a dinâmica da eliminação de ovos por grama de fezes (OPG) dos ovinos da raça Santa Inês infectados experimentalmente por *F. hepatica* na fase aguda e crônica da doença.
- b) Avaliar os sinais clínicos, escore de condição corporal, ganho de peso dos ovinos da raça Santa Inês infectados experimentalmente por *F. hepatica* na fase aguda e crônica da doença.
- c) Acompanhar os valores hematológicos (hematócrito, hemácia, hemoglobina, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina média, concentração de hemoglobina corpuscular média, plaquetas, leucócitos totais e diferenciais) de ovinos da raça Santa Inês infectados experimentalmente por *F. hepatica* na fase aguda e crônica da doença.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção de ovos e miracídios

Os ovos utilizados para obtenção de miracídios foram provenientes de fezes coletadas de ovinos infectados por *F. hepatica*. As amostras de fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixas de isopor contendo gelo até o LABHELVET-ICB/UFMG para separação dos ovos segundo Girão & Ueno (1985). As amostras de fezes foram homogeneizadas, 2 g foram pesadas e adicionadas em béquer com água de torneira, posteriormente com auxílio de bastão de vidro foram maceradas. Em seguida, a mistura foi passada em conjunto de quatro tamises sobrepostos na sequência de ordem 100, 180, 200 e 250 malhas/polegadas, com aberturas de 174, 96, 87 e 65 µm, respectivamente. Os ovos de *F. hepatica* retidos no último tamis (250 malhas/polegada) foram recolhidos em copo plástico, utilizando jato de água no sentido oposto ao da lavagem. Esse conteúdo foi decantado e o sedimento transferido para placa de Petri. Os ovos foram coletados e contados em microscópio estereoscópico no aumento de 20 X com auxílio de pipeta de Pasteur e alocados em placa de Petri contendo água e incubados em estufa a 27°C. Após o 8º dia, as placas foram examinadas diariamente em microscópio estereoscópico, para acompanhar o desenvolvimento dos miracídios. Quando os miracídios estavam completamente formados, as placas foram colocadas sob foco de luz incandescente de 60 watts a 50 cm distância para induzir a eclosão dos miracídios, que foram utilizados no protocolo abaixo.

### 5.2 Origem e infecção experimental de *Lymnaea columella* por *F. hepatica*

Foram utilizados *Lymnaea columella* para as infecções experimentais provenientes do LABHELVET-ICB/UFMG. Os moluscos são mantidos em cubas plásticas de tamanho 25x 6x 10 cm contendo 500 mL de água desclorada e cinco placas de isopor na medida de 4x 4x 1x para postura, cobertas com tela de malha de 2 mm de abertura, alimentados com folhas de alface “*ad libitum*” e ração balanceada, segundo Pelegrino e Katz, (1968), adicionado carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). A infecção dos moluscos foi realizada utilizando espécimes com tamanho

de 4 a 5 mm de concha, colocados individualmente em poços de placas de poliestireno (FALCON® 3047) contendo 2 mL de água desclorada onde foram adicionados 3 miracídios com auxílio de pipeta de Pasteur, expostas a foco de luz incandescente de 60 W a 50 cm distância por 24 horas. Ao final desse período, cada poço foi inspecionado em microscópio estereoscópico 40X para confirmação da infecção. Posteriormente os moluscos foram transferidos para cubas plásticas de criação e mantidos como descrito acima.

### **5.3 Obtenção das metacercárias de *F. hepatica***

Aos 50 dias após infecção, os moluscos foram transferidos para placa de petri forradas com papel celofane contendo água desclorada. Diariamente, as placas foram examinadas em microscópio estereoscópico no aumento de 40 X para observar a emergência de cercárias e a formação de metacercárias.

Após 72 horas de formadas as metacercárias, foram retiradas do papel celofane com auxílio de agulha de insulina e transferidas para placas de Petri. Amostras com 150 metacercárias foram armazenadas em ágar-ágar gepulvert, segundo Mendes e Lima (2012). Esse processo constitui resumidamente na utilização de seringas plásticas de 10 mL, cortadas transversalmente na região do bico e vedado com tampa plástica de tubo Falcon®. Foram pesadas 4 g de ágar-ágar gepulvert ©Merck Chemicals, Germany, diluído em 100 mL de água aquecida a 70 °C em Becker. Em seguida a solução foi homogeneizada, aquecida em Agitador Magnético com Aquecimento CT-103 (CIEN TEC) na velocidade de 100 rpm, durante 10 minutos, na temperatura de 50°C, para diluição uniforme. No interior da seringa, no centro foi colocado bastão de vidro com 0,5 cm de diâmetro. Este foi preso à borda superior da seringa, por tampa plástica com orifício no centro. Posteriormente a solução de ágar foi distribuída em cada seringa e imersa em caixa de isopor com gelo. Após o resfriamento do ágar o bastão de vidro foi retirado, e o orifício formado preenchido com 150 metacercárias com auxílio de pipeta de Pasteur. Em seguida, 1 mL da solução do ágar, foi colocada para vedar o orifício e o material armazenado a 4 °C, até a utilização.

#### **5.4 Infecção experimental dos ovinos da Raça Santa Inês por *F. hepatica***

Foram utilizadas 14 ovelhas da raça Santa Inês, com idade de dezoito meses, peso médio de 24,5 kg. Os animais foram identificados com brincos plásticos numerados e tratados com 200 µg/kg de doramectina (Dectomax- Laboratório Pfizer) via subcutânea contra helmintos gastrointestinais uma semana antes de realizar a infecção experimental por *F. hepatica*.

Os ovinos foram mantidos em uma propriedade localizada no município de Curvelo-MG (18° 52' 25.7" de Latitude Sul, 44° 36' 32.4" de Longitude Oeste), onde todo o experimento foi conduzido conforme definido na Resolução Normativa CONCEA nº 22, de 25 de junho de 2015. Os procedimentos experimentais realizados receberam aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) sob protocolo número 15/2016.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Grupo 1 (G1), composto de 9 ovinos infectados individualmente com 150 metacercárias de *F. hepatica* e o grupo 2 (G2), controle, constituído de 5 ovinos não infectados. Os animais do G1 foram contidos por imobilização manual e receberam individualmente por via oral as metacercárias inseridas nas seringas contendo gelatina. Após a inoculação, os animais foram monitorados durante uma hora para observar a ocorrência de reações adversas ou regurgitação do inóculo. Durante todo período experimental de 400 dias, os animais permaneceram alojados em duas baias coletivas com solário na proporção de um animal por dois metros quadrados. As baias possuíam piso ripado, de modo que as fezes e a urina não entrassem em contato com os animais, facilitando a limpeza. As fezes eram recolhidas diariamente, parte armazenada para análise e o restante incinerado. Os animais de ambos os grupos foram alimentados com silagem de milho, feno, ração comercial (Guabi, 18% proteína), sal mineral e água *ad libitum*.

#### **5.5 Cinética da eliminação de ovos por grama de fezes *F. hepatica***

Foram realizadas coletas de fezes diariamente a partir de 55 dpi para observar o período pré-patente e, posteriormente, nos intervalos de 90, 120, 150, 180, 210,

240, 270, 300, 330, 360 e 390 dias, para avaliar a cinética de eliminação de ovos por grama de fezes, como descrita no item 5.1.

## 5.6 Avaliação clínica

Foram realizados exames clínicos individuais dos ovinos de ambos os grupos no dia da infecção e aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390 dias após a infecção (dpi).

Avaliação clínica foi realizada seguindo a sequência dos números dos animais, com início às 7 horas da manhã e com as seguintes avaliações:

Pesagem dos ovinos individualmente em balança mecânica, para verificar o ganho de peso. Os ovinos permaneceram em jejum de 12 horas para evitar a variação de alimentos do sistema gastrintestinal.

Avaliação visual do comportamento, do contorno abdominal e da presença de edema submandibular. Em seguida, os animais foram contidos manualmente, para avaliação, das frequências cardíaca e respiratória, da coloração da mucosa ocular, da condição corporal e da sensibilidade hepática dolorosa. Todos os dados foram anotados em ficha técnica criada para esse objetivo (**ANEXO I**).

A frequência cardíaca (FC) foi avaliada com auxílio de estetoscópio na região do coração entre o 2° e o 6° espaço intercostal, à meia altura do tórax. A auscultação cardíaca foi realizada por um minuto marcado no cronômetro e o resultado fornecido em batimentos cardíacos por minuto (Kolb 1981).

A frequência respiratória (FR) foi avaliada também com o auxílio do estetoscópio. Foi auscultada a frequência respiratória na região laríngeo-traqueal por um minuto marcado no cronômetro e o resultado fornecido em frequência respiratória por minuto (Swenson & Reece 1996).

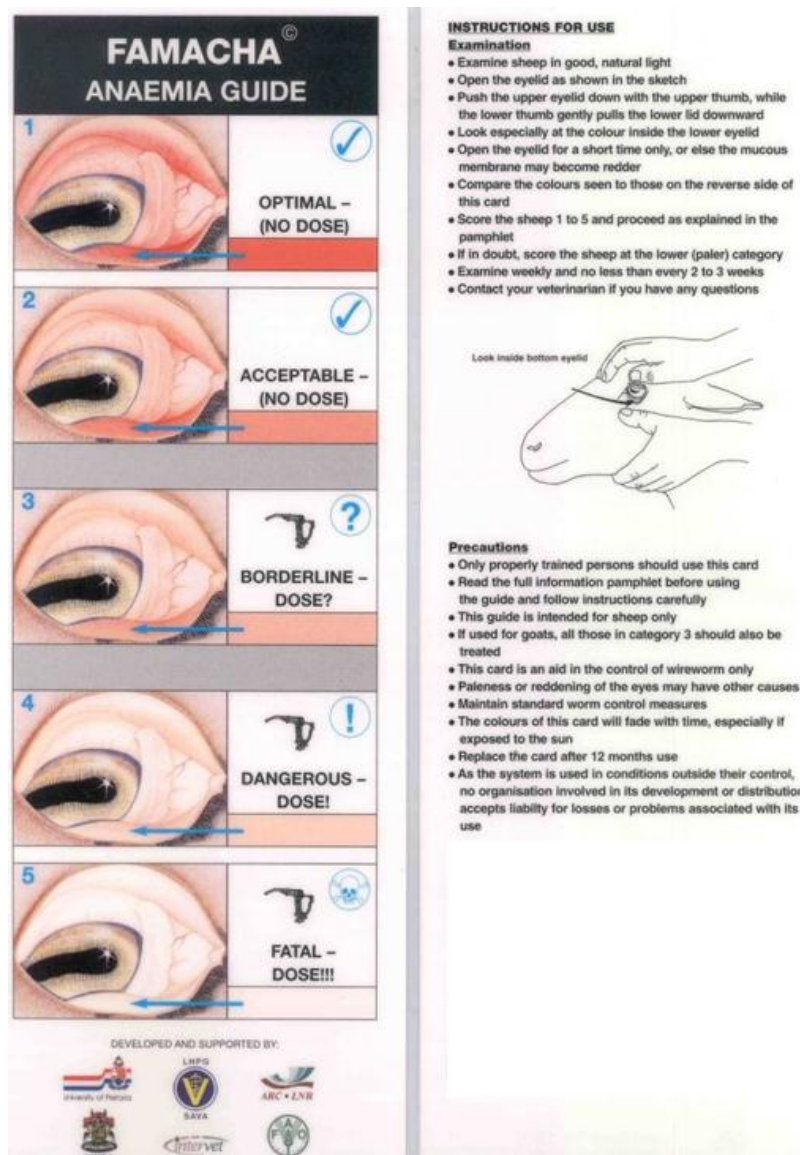
A avaliação da mucosa ocular foi realizada por meio do método Famacha®, descrito por Bath & Van Wyk (2001) (**FIGURA 1**). Segundo os autores, pela coloração da mucosa ocular avalia-se o grau de anemia do animal, como demonstrado na **TABELA 1**. As diferentes colorações das mucosas oculares, correspondem à classificação de 1 a 5 no grau de anemia e variam entre vermelho, rosa-vermelho, rosa, rosa-pálido e branco; sendo que os graus 1 e 2 do Famacha®

identificam o animal como saudável, apresentando mucosa ocular bem vascularizada e com valores de hematócrito superior ou igual a 23%; já os graus 3, 4 e 5 identificam o animal como anêmico, que apresenta mucosa hipocrômica, sendo o hematócrito menor ou igual a 18%.

**Tabela 1 – Graus do método Famacha®, colorações das mucosas e hematócritos dos ovinos (Bath & Van Wyk, 2001)**

<b>Grau de Famacha®</b>	<b>Coloração</b>	<b>Hematócrito (%)</b>
<b>1</b>	Vermelho robusto	>27
<b>2</b>	Vermelho rosado	23 a 27
<b>3</b>	Rosa	18 a 22
<b>4</b>	Rosa pálido	13 a 17
<b>5</b>	Branco	<13

Figura 1 – Cartão de análise para o método FAMACHA®



Fonte: Bath & Van Wyk (2001)

A avaliação da condição corporal foi baseada na escala de 0 a 5 pontos, segundo técnica descrita por Jefferies (1961). A avaliação foi realizada por palpação das protuberâncias ósseas como demonstrado na **TABELA 2**:

**Tabela 2 – Avaliação do escore da condição corporal dos ovinos**

<b>Escore</b>	<b>Avaliação</b>
1      Caquético	Os processos transversos, os processos espinhosos proeminentes e visíveis. Total visibilidade das costelas, a cauda está totalmente inclusa dentro do coxal, os íleos e os ísquios mostram-se expostos. Há atrofia muscular pronunciada, e é como se houvesse a visão direta do esqueleto do animal (aparência de "pele e osso").
2      Magro	Os ossos estão bastante salientes, com certa proeminência dos processos dorsais, dos íleos e dos ísquios. As costelas têm pouca cobertura, os processos transversos permanecem visíveis e a cauda está menos inclusa nos coxais (aparência mais alta). A pele está firmemente aderida no corpo (pele esticada).
3      Médio	Há suave cobertura muscular com grupos de músculos à vista. Os processos dorsais estão pouco visíveis; as costelas, quase cobertas; e os processos transversos, pouco aparentes. Ainda não há camadas de gordura; a superfície do corpo está macia e a pele está flexível (pode ser levantada com facilidade).
4      Gordo	Há boa cobertura muscular, com alguma deposição de gordura na inserção da cauda. As costelas e os processos transversos estão completamente cobertos. As regiões individuais do corpo ainda são bem definidas, embora as partes angulares do esqueleto pareçam menos identificáveis.
5      Obeso	Todos os ângulos do corpo estão cobertos, incluindo as partes salientes do esqueleto, onde aparecem camadas de gordura (base da cauda e maçã do peito). As partes individuais do corpo ficam mais difíceis de ser distinguidas e o animal tem aparência arredondada. Esse estado só é aceitável para animais terminados, prontos para o abate.

A sensibilidade hepática dolorosa foi avaliada por meio da palpação do 12º espaço intercostal do lado direito, no quadrante superior da porção posterior. Essa avaliação permite saber se o fígado está aumentado e se o animal apresenta dor durante a palpação (Rosemberg 1993).

## **5.7 Avaliação hematológica**

### **5.7.1 Coleta de sangue dos ovinos**

Foram coletados 5 ml de sangue da veia jugular de cada animal no dia da infecção e aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390 dias após infecção (dpi) com seringa e agulha estéril (calibre 22G). As amostras foram acondicionadas em tubos de hemólise contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% devidamente identificado, armazenado em caixa de isopor contendo gelo, transportado até o LabHelVet/ICB/UFMG e analisado 24 horas após a coleta.

As amostras foram utilizadas para avaliação dos parâmetros hematológicos, contagens totais dos leucócitos (Le), hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), concentração média de hemoglobina (CMH), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas (PL). As amostras de sangue foram processadas utilizando o contador hematológico automático (Modelo Bio – 2900 Vet – Bioeasy) (**Figura 2**). As precisões nessas contagens apresentam uma variação de 2% a 5%. O resultado é expresso em display digital ou por meio de impressora anexa.

**Figura 2 – Contador hematológico automático (Modelo Bio – 2900 Vet – Bioeasy)**



Fonte: Fotografia do autor

### **5.7.2 Contagem diferencial dos leucócitos**

De cada amostra de sangue foram realizados esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro para contagens diferenciais dos leucócitos, segundo a técnica descrita por Sinclair (1962). Os esfregaços foram corados pelo método (Panótico Rápido LB, Laborclin). Posteriormente, foram realizadas as contagens diferenciais dos leucócitos (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos) utilizando objetiva de 100x. Foram contadas 200 células em cada lâmina e o número de cada tipo celular calculado a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de leucócitos, para obter-se o valor absoluto.

## **5.8 Avaliação macroscópica do fígado parasitado por *F. hepatica***

Durante o experimento, dois ovinos infectados morreram, aos 300 dpi e o outro aos 330 dpi. Realizou-se as necropsias com os animais colocados em decúbito dorsal. Com auxílio de uma faca foi feita incisão na linha alba para chegar a cavidade abdominal e visualizar o fígado. Realizou-se a retirada do órgão por tração no sentido caudal e secção entre o diafragma e o fígado, liberando-o da cavidade. O fígado foi colocado em uma bandeja contendo solução fisiológica e realizada avaliação macroscópica, como lesões, fibroses, presença de fibrina, formato e tamanho do órgão. Em seguida, os ductos biliares foram abertos usando uma tesoura, faca para a recuperação dos parasitos e análise da consistência dos ductos. Todos os dados observados foram registrados em ficha individual.

Os parasitos recuperados foram contados, comprimidos entre duas placas de vidro e fixados em solução de formol tamponado a 10%.

## **5.9 Análise estatística**

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T Student para dados paramétricos. Além disso, foram utilizados, para determinar as diferenças significativas entre as médias dos grupos analisados, os testes Two Away ANOVA, seguido do de Bonferroni (dados paramétricos). As avaliações clínicas foram realizadas descritivamente.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Avaliação parasitológica

#### 6.1.1 Dinâmica da eliminação de ovos de *Fasciola hepatica*

Na **TABELA 3** encontram-se os valores médios e o desvio padrão das contagens de OPG dos ovinos da raça Santa Inês infectados com metacercárias de *Fasciola hepatica*. Os primeiros ovos de *F. hepatica* nas fezes dos ovinos foram observados aos 60 dpi em três animais, 33,3%; os demais 66,7% tornaram-se positivos aos 62 dpi. Após o período pré-patente, as contagens de OPG aumentaram gradativamente até os 120 dpi. Em seguida, diminuíram até os 180 dpi, voltando a aumentar aos 210 dpi. Essa oscilação na dinâmica da eliminação de ovos coincide com a chegada gradativa dos estágios imaturos nos ductos biliares, enquanto adultos já realizam a postura. Deve-se ressaltar que ocorreu variação individual nas contagens de OPG dentro do grupo, o que influenciou as contagens médias de OPG. Como pôde ser observado, aos 330 dpi, os ovinos números quatro, sete e nove (3/9) apresentaram aumento nas contagens de OPG, enquanto o restante dos ovinos infectados (5/9) reduziam. Nesse intervalo, o ovino quatro morreu, apresentando contagens de OPG equivalente a 1296, aumentando significativamente a média do grupo. Aos 390 dpi todos os ovinos apresentaram aumento no número de OPG, sendo que, a menor contagem observada foi 74 e a maior, 726.

**Tabela 3 – Número de ovos por grama de fezes (OPG) dos ovinos da raça Santa Inês infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

Dpi	Grupo infectado									Média ± DP
	N° dos animais									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
60	11	12	-	-	-	-	-	17	-	4,4 ± 7
62	23	42	39	33	22	13	06	59	10	14 ± 15
90	37	163	521	45	29	99	147	24	254	147 ± 160
120	605	343	582	27	33	231	270	425	125	293 ± 216
150	433	138	350	18	63	125	136	347	297	212 ± 147
180	185	454	268	22	79	97	368	226	373	230 ± 149
210	234	358	661	167	317	415	341	783	419	411 ± 196
240	284	470	631	218	112	527	507	519	401	408 ± 169
270	524	533	495	284	151	210	376	252	143	330 ± 157
300	377	708	262	Ob	208	20	174	94	306	255 ± 201
330	178	233	1296	Ob	46	47	110	246	291	306 ± 410
360	372	177	Ob	Ob	60	98	156	372	203	205 ± 123
390	396	233	Ob	Ob	74	710	216	726	481	509 ± 464
Média	280	294	464	102	77	211	210	382	242	
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
DP	94	208	356	105	83	214	154	387	154	

(Dpi) Dias após infecção, (DP) Desvio padrão

## 6.2 Parâmetros Clínicos

As alterações clínicas avaliadas nos ovinos experimentalmente infectados com metacercárias de *F. hepatica* foram prostração, sensibilidade hepática dolorosa, edema submandibular, taquicardia, taquipnéia, mucosa ocular hipocrômica, perda de escore corporal e peso.

Como demonstrado na **TABELA 4**, observou-se prostração, caracterizada por apatia, em alguns animais infectados ao longo do estudo. Apatia foi verificada no 15° dpi no ovino nove, aos 30° dpi nos animais cinco e nove, aos 45° dpi nos ovinos três e seis, ao 60° dpi nos animais quatro, cinco e 10, aos 90° dpi nos ovinos cinco e seis, aos 150° dpi nos animais três e 10, aos 180°, 210°, 240° dpi no ovino 10, aos

270° dpi nos ovinos três e cinco, no 300° dpi nos ovinos seis e oito e aos 330° dpi nos ovinos três, sete e oito.

Observou-se sensibilidade hepática dolorosa em seis animais (66,7%) no 15° dpi; no 30° dpi, esse sinal clínico permaneceu em cinco animais (55%). Após os 45°dpi, diminuiu o número de animais com esse sinal. Somente os animais nove e 10 (22,2%) não apresentaram sensibilidade hepática dolorosa durante o período experimental. Os demais apresentaram sensação dolorosa em alguma fase do experimento (**TABELA 5**).

Edema submandibular somente foi observado no ovino número quatro, aos 270 dpi; no 330 dpi o animal morreu.

**Tabela 4 – Parâmetro clínico de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

Dpi	Prostração														
	Infectado										Controle				
	N° dos animais										N° dos animais				
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
45	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
90	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
150	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
180	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
210	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
240	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
270	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
300	-	-	-	Ob	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
330	-	+	Ob	Ob	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
360	-	-	Ob	Ob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
390	-	-	Ob	Ob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(Dpi) Dias após infecção; (Ob) óbito; (-) ausência; (+) presença

**Tabela 5 – Parâmetro clínico de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

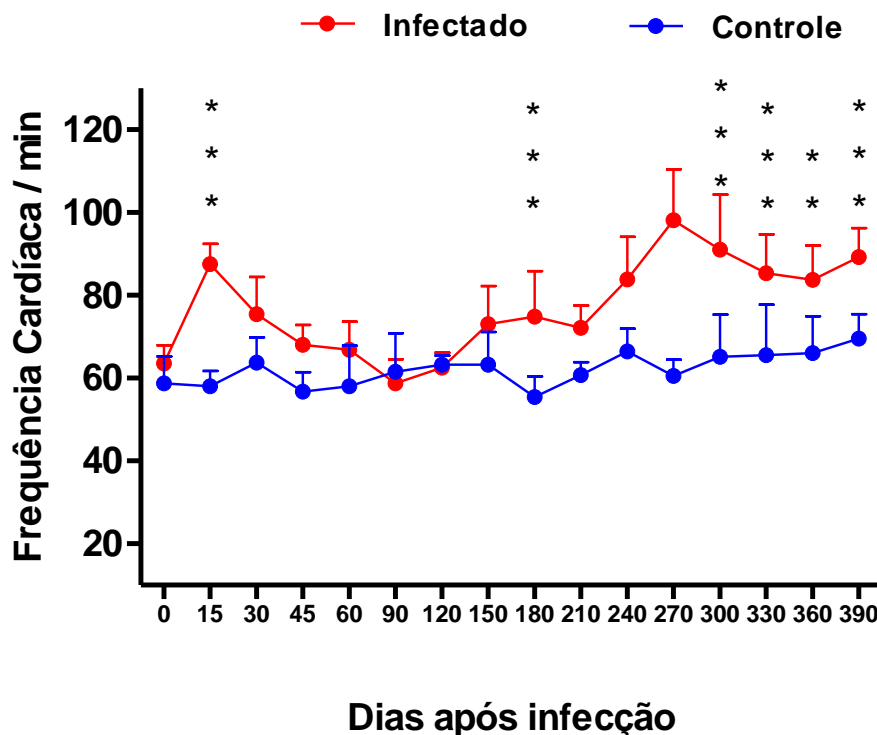
Sensibilidade hepática dolorosa														
Grupos														
Dpi	Infectado									Controle				
	N° dos Animais									N° dos Animais				
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
30	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
45	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
90	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
180	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
210	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
240	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
270	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	-	-	-	Ob	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
330	-	+	Ob	Ob	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
360	-	-	Ob	Ob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
390	-	-	Ob	Ob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(Dpi) Dias após infecção; (Ob) óbito; (-) ausência; (+) presença

### 6.2.1 Frequência cardíaca

As frequências cardíacas dos ovinos da raça Santa Inês infectados com metacercárias de *Fasciola hepatica* e controle estão apresentados no **GRÁFICO 1**. As frequências cardíacas médias durante o período experimental apresentaram oscilações menores no grupo controle em relação aos ovinos infectados. Além disso, ao final do período experimental, o grupo infectado apresentou as maiores médias quando comparado ao início do estudo. Foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo infectado e grupo controle aos 15 dpi ( $p < 0,001$ ), 180 dpi ( $p < 0,001$ ), 300 dpi ( $p < 0,001$ ), 330 dpi ( $p < 0,001$ ), 360 dpi ( $p < 0,01$ ) e 390 dpi ( $p < 0,001$ ).

**Gráfico 1 – Frequência cardíaca dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

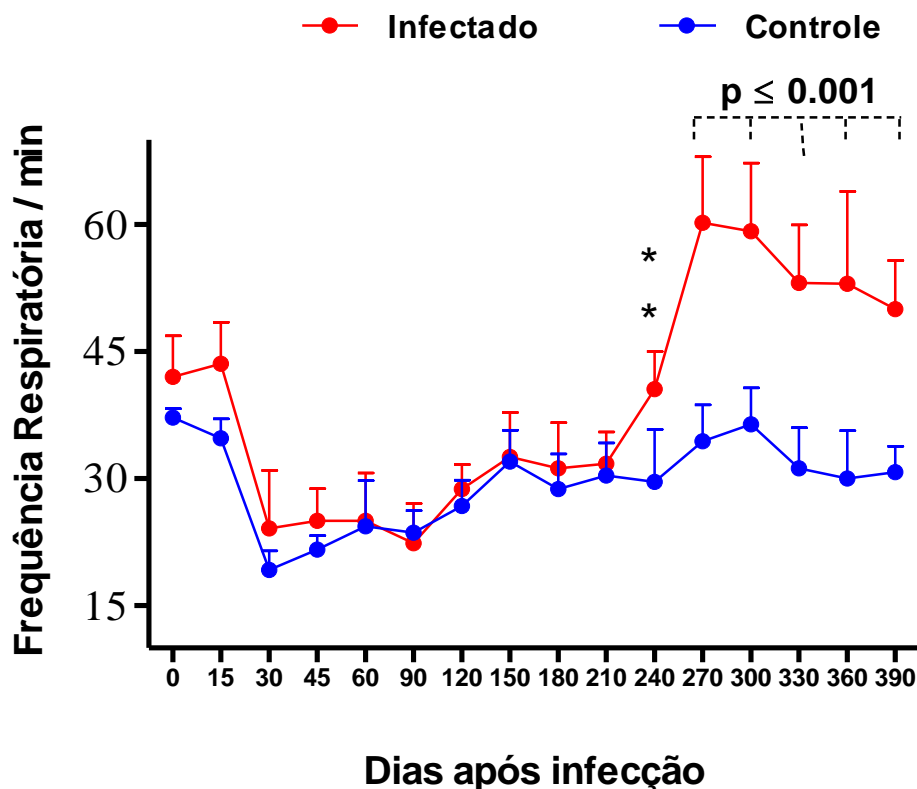


\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectado

### 6.2.2 Frequência respiratória

No **GRÁFICO 2** encontram-se os valores médios das frequências respiratórias dos ovinos da raça Santa Inês infectados e controles durante o desenvolvimento de *Fasciola hepatica*. Observa-se que as frequências respiratórias até 210 dpi apresentaram valores similares entre os grupos. A partir dos 240 dpi, a frequência respiratória dos ovinos infectados foi maior que dos controles, com diferenças estatisticamente significativas até o final do período experimental, com os seguinte valores: no 240 dpi ( $p < 0,01$ ), 270 dpi ( $p < 0,001$ ), 300 dpi ( $p < 0,001$ ), 330 dpi ( $p < 0,001$ ), 360 dpi ( $p < 0,001$ ) e 390 dpi ( $p < 0,001$ ).

**Gráfico 2 – Frequência respiratória dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



\*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001 representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectado

### 6.2.3 Índice FAMACHA©

O método de Famacha©, medida indireta para avaliar o grau de anemia por meio da avaliação da coloração da mucosa ocular, está representado na **TABELA 6**. Os índices médios de Famacha© de ambos os grupos apresentaram oscilações durante o período experimental. Nos ovinos infectados, os índices foram 2, 3, 4 e 5; já o grupo controle apresentou índices 2 e 3.

No grupo infectado, aos 30 dpi, quatro ovinos apresentaram índice 3 e cinco índice 4; aos 45 dpi, cinco animais apresentavam índice 3 e três índice 4. Dos 60 aos 150 dpi o índice de Famacha© 3 prevaleceu entre os animais infectados. Dos 180 dpi aos 390 dpi ocorreu o inverso: a coloração da mucosa rosa (índice 4) voltou a aumentar. Aos 300 e 330 dpi, ocorreu a presença do índice 5 nos animais 4 e 5, que morreram nesse período.

**Tabela 6 – Índice Famacha© de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

Dpi	Índice FAMACHA														
	Grupo Infectado										Grupo Controle				
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0	3	2	3	2	3	2	2	3	3	2	3	2	3	2	
15	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
30	4	3	4	4	4	3	3	3	4	3	3	2	2	3	
45	3	2	3	4	3	4	3	4	3	2	3	2	2	3	
60	3	3	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
90	3	3	3	4	4	3	3	3	3	2	2	3	2	2	
120	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	
150	3	4	3	3	3	4	3	3	3	2	3	2	2	3	
180	3	3	4	4	3	3	4	4	4	3	2	2	2	3	
210	3	4	4	4	4	3	3	4	3	3	3	3	3	3	
240	3	4	3	4	3	4	3	3	3	3	2	2	3	3	
270	2	3	4	4	3	3	4	4	4	3	2	3	3	3	
300	4	3	5	5	3	4	4	4	4	3	3	3	3	3	
330	4	4	5	Ob	3	3	4	3	4	3	3	2	3	3	
360	3	3	Ob	Ob	3	4	4	4	3	3	3	3	3	3	
390	4	3	Ob	Ob	3	4	3	4	3	3	2	2	3	3	

(Dpi) Dias após infecção; Ob: óbito

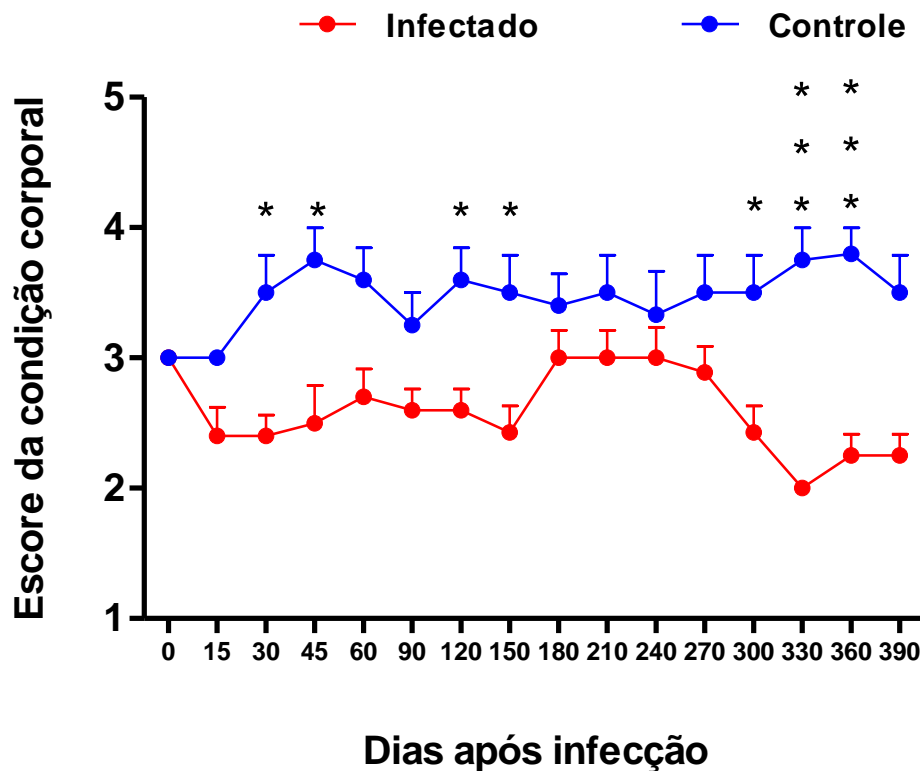
#### 6.2.4 Escore da condição corporal

No **GRÁFICO 3** encontra-se o escore da condição corporal dos ovinos da raça Santa Inês distribuídos nos grupos infectado e controle durante o período experimental com *Fasciola hepatica*.

No grupo infectado, o índice médio variou entre 2 e 3 ao longo do estudo. No início do experimento, o índice médio foi 3; aos 15, 30, 150 e 300 dpi (2.4); aos 45 dpi (2.5); aos 60 dpi (2.7); aos 90, 120dpi (2.6); aos 180, 210 e 240dpi (3); 270 dpi (2.8); 330 dpi (2) e 360 dpi (2.25).

No grupo controle, oscilações no índice médio da condição corporal também foram observadas, com aumento ao longo do estudo. No 0 e 15 dpi (3); 30, 150, 210, 270 e 300 dpi (3.5); 45 e 330 dpi (3.75); 60 e 120 dpi (3.6); 90 dpi (3.2); 180 dpi (3.4); 240 dpi (3.3); 360 dpi (3.8). Diferenças estatísticas ocorreram entre os grupos aos 30 ( $p < 0,05$ ), 45 ( $p < 0,05$ ), 120 ( $p < 0,05$ ), 150 ( $p < 0,05$ ), 300 ( $p < 0,05$ ), 330 ( $p < 0,001$ ) e aos 360 dpi ( $p < 0,001$ ).

**Gráfico 3 – Escore de condição corporal dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectado.

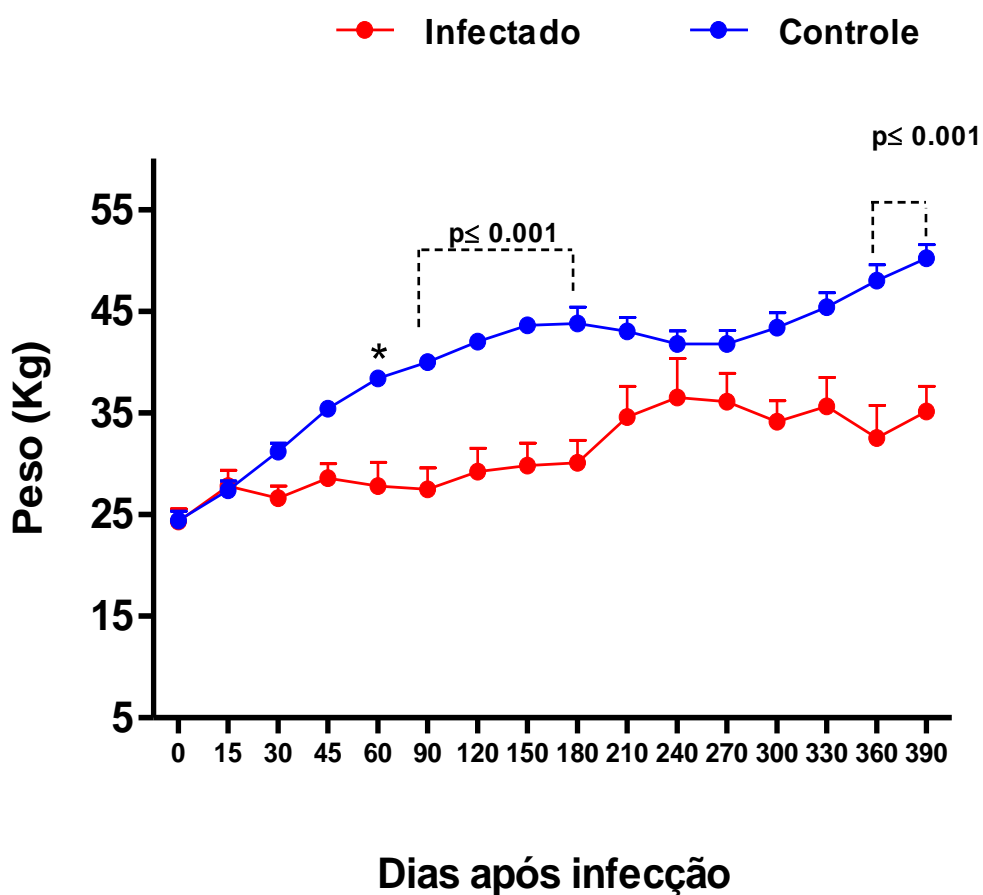
### 6.2.5 Desenvolvimento ponderal

No **GRÁFICO 4** estão representados os resultados referentes ao peso médio dos grupos de ovinos controles e infectados. Até os 15 dpi, o peso médio de ambos os grupos foram semelhantes. Aos 30 dpi, o grupo controle ganhou 3,8 Kg, enquanto os ovinos infectados perderam 0,9 kg.

A partir dos 45 dpi, ambos os grupos continuaram com tendência a ganhar peso na maioria do período experimental; no entanto, o grupo controle ganhava mais peso do que o grupo infectado.

No início do estudo, o peso inicial dos ovinos infectados e controle eram 24,5 Kg, ao final do período experimental o peso médio dos ovinos infectados foi 35 Kg e os do grupo controle 50 Kg, apresentando diferença de 15 Kg. Esse resultado demonstra o efeito negativo da *F. hepatica* no desenvolvimento ponderal dos ovinos.

**Gráfico 4 – Desenvolvimento ponderal dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



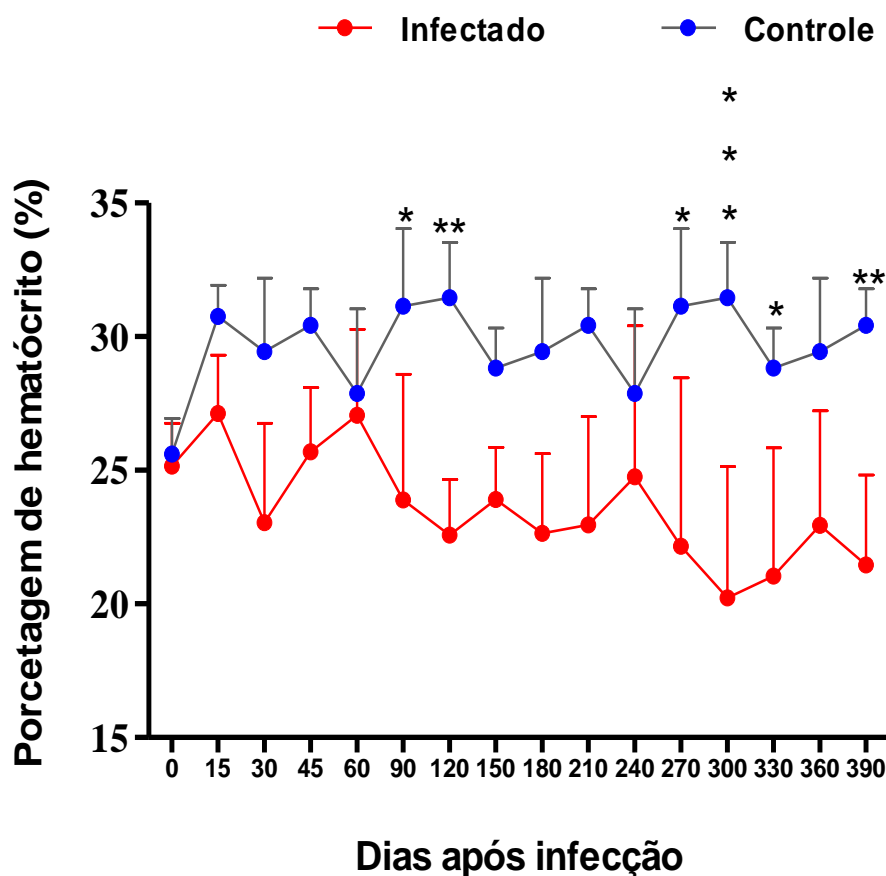
\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectado

## 6.3 Avaliação hematológica

### 6.3.1 Hematócrito

No **GRÁFICO 5** encontram-se os valores médios de hematócrito dos grupos infectado e controle durante o estudo. Os valores médios dos hematócritos encontrados nos ovinos infectados ao longo do estudo foram inferiores aos observados no grupo controle. Além disso, os valores médios do grupo controle apresentaram menores oscilações ao longo do experimento. Diferenças estatísticas foram observadas entre os ovinos infectados e os ovinos controles aos 90 ( $p < 0,05$ ), 120 ( $p < 0,01$ ), 270 ( $p < 0,05$ ), 300 ( $p < 0,001$ ), 330 ( $p < 0,05$ ), e 390 ( $p < 0,01$ ) dpi.

**Gráfico 5 – Valores médios de hematócrito dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



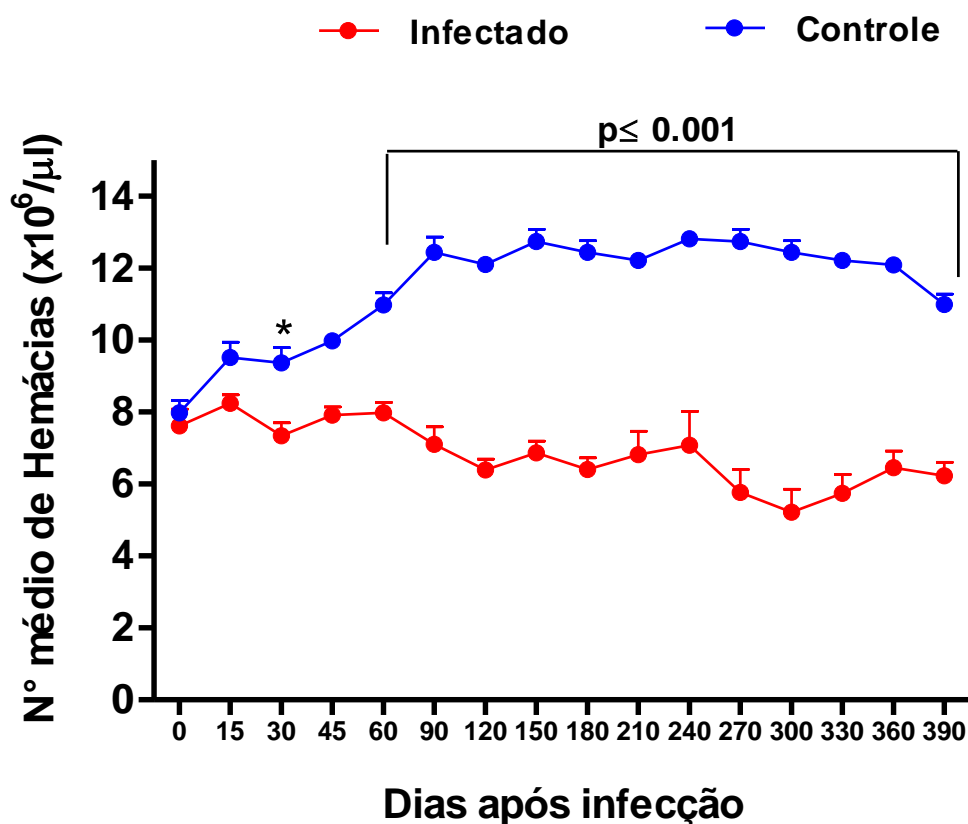
\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectado

### 6.3.2 Contagem total de hemácias

No **GRÁFICO 6** encontram-se os valores médios das contagens totais de hemácias dos grupos infectado e controle.

Durante o experimento ocorreram variações nos valores médios dos eritrócitos nos grupos estudados. A partir da segunda coleta de sangue, no 15º dpi, foi observado que o número de hemácias dos ovinos do grupo infectado começou a reduzir, ficando abaixo do valor encontrado para o grupo controle. Essa diferença foi verificada em todo período experimental. Houve diferenças estatísticas significativas aos 30 dpi ( $p < 0,05$ ), e dos 60 dpi até os 390 dpi ( $p < 0,001$ ) nas contagens médias de hemácias entre o grupo infectado em relação ao controle.

**Gráfico 6 – Valores médios das contagens totais de hemácias dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

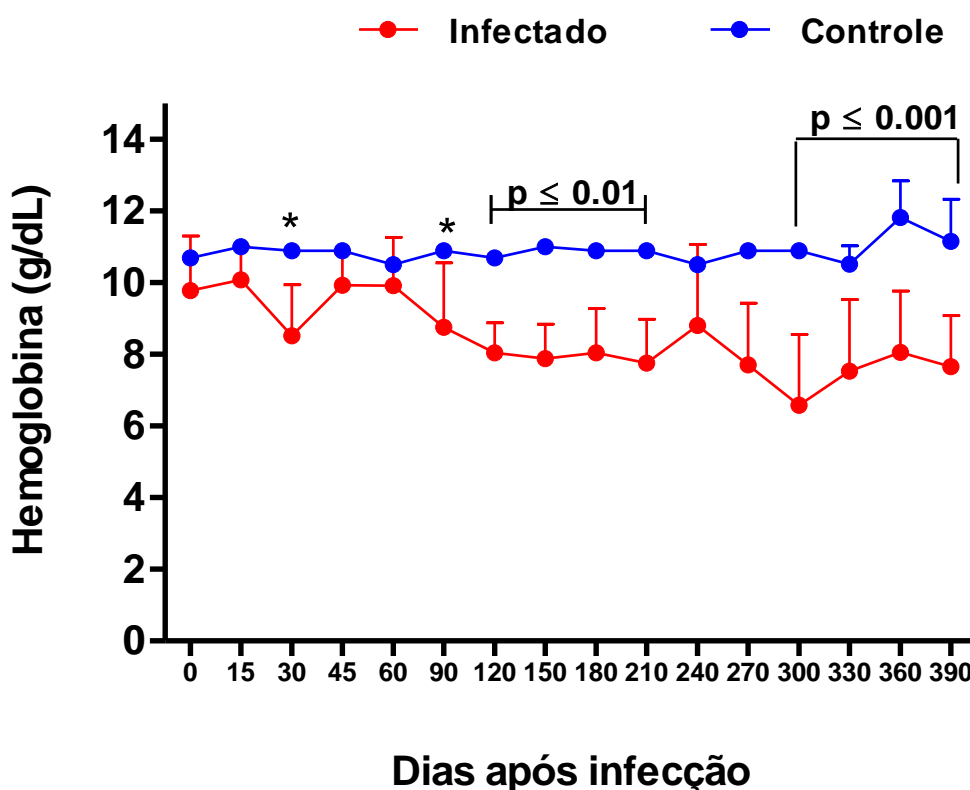


\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectado

### 6.3.3 Hemoglobina

No **GRÁFICO 7** encontram-se os valores médios de hemoglobina dos grupos infectado e controle. A partir da segunda coleta de sangue, no 15º dpi, foi observado que os valores de hemoglobina dos ovinos do grupo infectado começaram a reduzir, ficando abaixo dos ovinos do grupo controle. Essa diferença foi verificada em todo período experimental. Houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos aos 30 ( $p < 0,05$ ), 90 ( $p < 0,05$ ), 120 até 210 dpi ( $p < 0,01$ ), 270 ( $p < 0,001$ ), 300 ( $p < 0,001$ ), 330 ( $p < 0,001$ ), 360 ( $p < 0,001$ ) e 390 ( $p < 0,001$ ) dpi nas contagens médias de hemoglobina entre o grupo infectado em relação ao controle.

**Gráfico 7 – Valores médios da hemoglobina dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

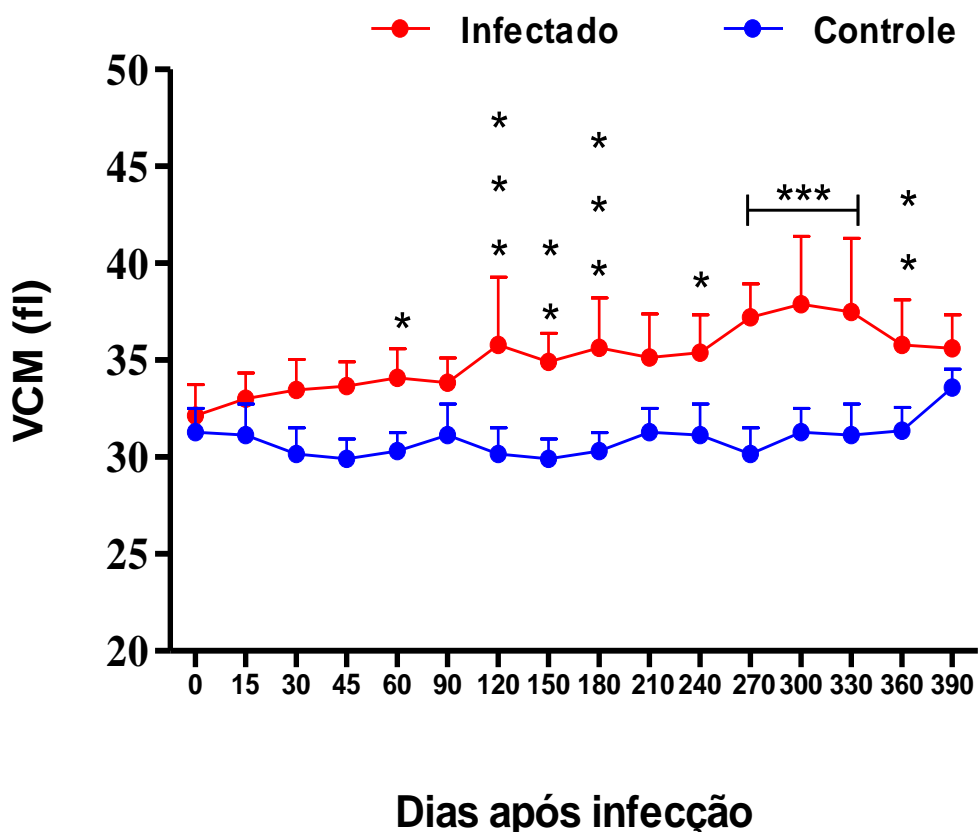


\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectado

### 6.3.4 Volume Corpuscular Médio

No **GRÁFICO 8** encontram-se os valores médios dos volumes corpusculares dos grupos infectado e controle. Os valores dos volumes corpusculares médios (VCM) dos dois grupos apresentaram variações. O grupo infectado apresentou valores médios superiores ao grupo controle na maioria do período experimental, ocorrendo diferenças estatísticas aos 60 ( $p < 0,05$ ), 120 ( $p < 0,001$ ), 150 ( $p < 0,01$ ), 180 ( $p < 0,001$ ), 240 ( $p < 0,05$ ), 270 ( $p < 0,001$ ), 300 ( $p < 0,001$ ), 330 ( $p < 0,001$ ) e 360 ( $p < 0,01$ ) dpi.

**Gráfico 8 – Valores médios dos volumes corpusculares dos ovinos da raça Santa Inês controle e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

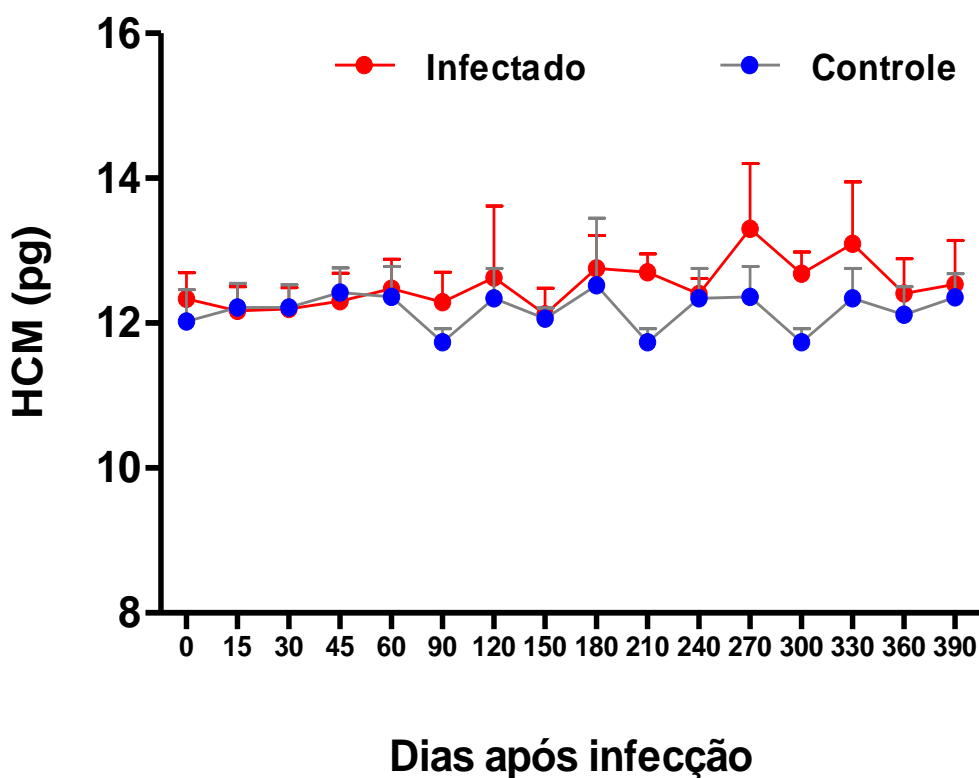


\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectado

### 6.3.5 Concentração Média de Hemoglobina

No **GRÁFICO 9** encontram-se os valores das concentrações médias de hemoglobina dos grupos infectado e controle durante o período experimental. Os valores das concentrações médias de hemoglobina dos ovinos infectados e não infectados foram semelhantes entre o dia 0 até os 60 dpi, variando entre 11,45 a 12,5 picograma (pg). Não foram verificadas diferenças significativas nas concentrações médias de hemoglobina entre os dois grupos durante todo o experimento, apesar dos ovinos infectados apresentarem concentrações médias de hemoglobina superiores a partir dos 60 dpi.

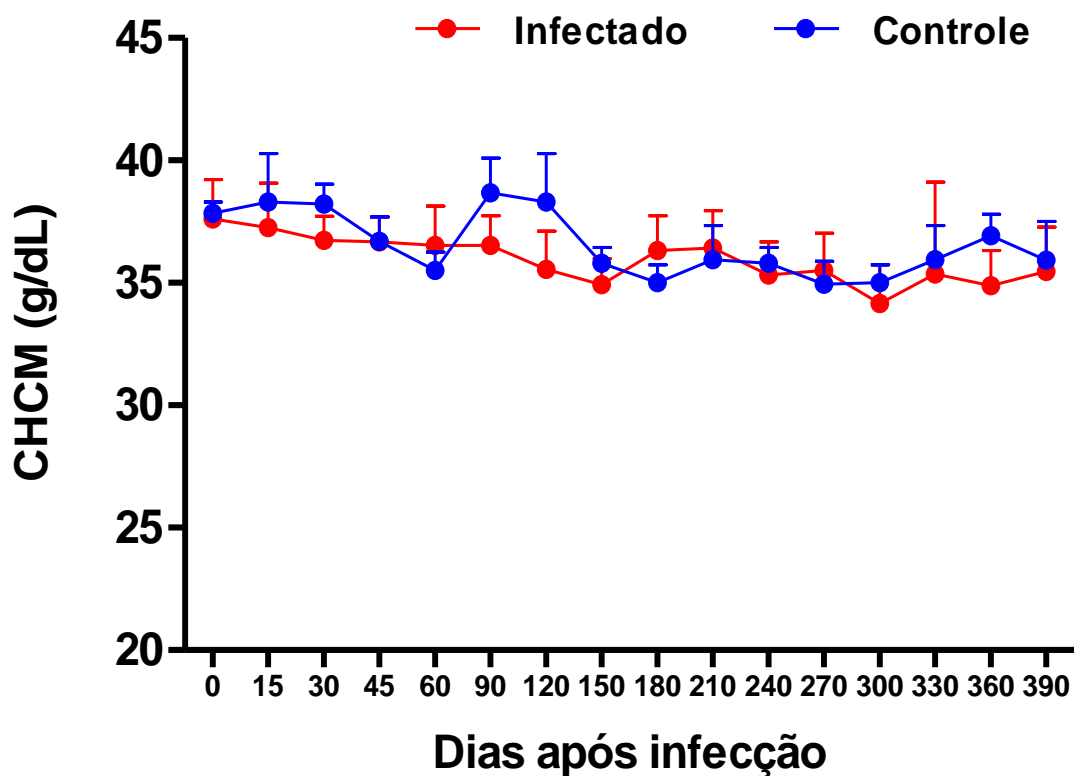
**Gráfico 9 – Valores das concentrações médias de hemoglobina dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



### 6.3.6 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

No **GRÁFICO 10** encontram-se os valores das concentrações de hemoglobina corpusculares médias dos grupos infectado e controle. A concentração de hemoglobina foi semelhante entre os animais dos grupos infectado e controle durante o estudo. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

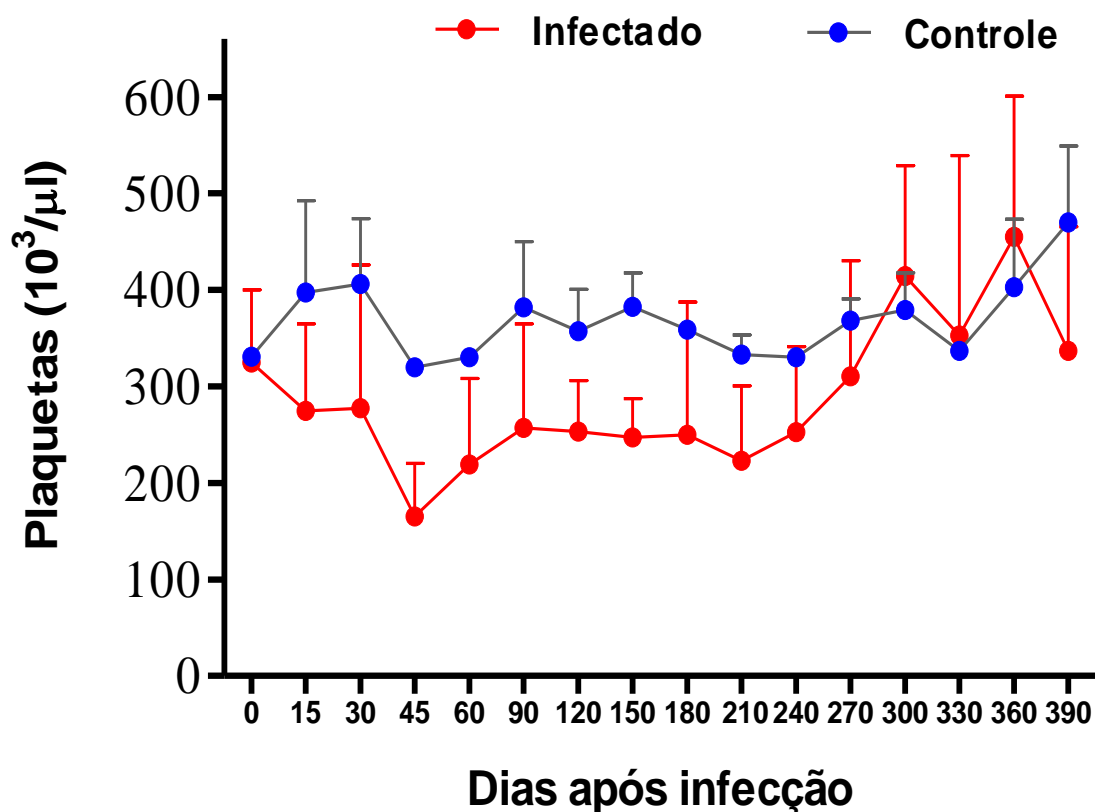
**Gráfico 10 – Valores da CHCM dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



### 6.3.7 Plaquetas

No **GRÁFICO 11** encontram-se os valores médios das plaquetas dos grupos infectado e controle. Os valores médios das plaquetas apresentaram oscilações em ambos os grupos infectado e controle. No entanto, não foram verificadas diferenças estatísticas entre o grupo infectado em relação ao grupo controle durante todo o experimento.

**Gráfico 11 – Valores médios das plaquetas dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



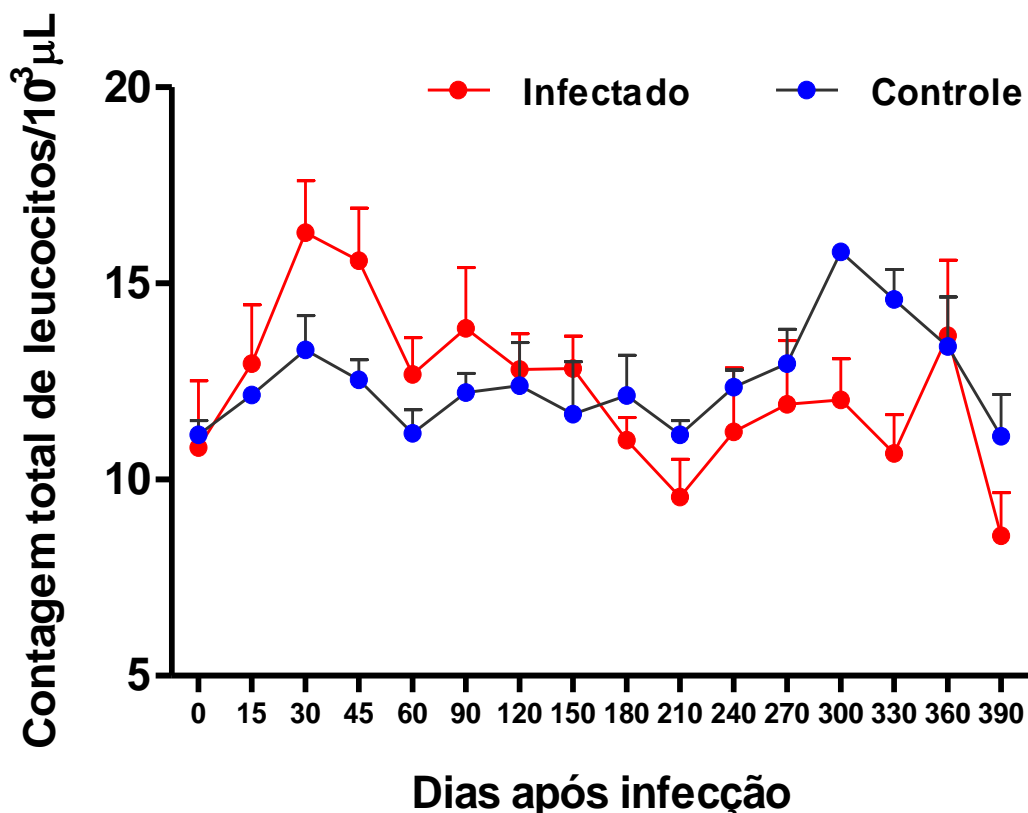
## 6.4 Leucograma

### 6.4.1 Contagens totais dos leucócitos

No **GRAFICO 12** encontram-se os valores médios das contagens totais dos leucócitos dos grupos infectado e controle após infecção com metacercárias de *Fasciola hepatica*. Os valores do grupo de ovinos infectados permaneceram acima dos valores encontrados no grupo não infectado dos 15 aos 150dpi. Após esse período, observou-se diminuição nas contagens totais dos leucócitos do grupo infectado em relação ao grupo controle até os 390 dpi.

No entanto, não houve diferenças estatísticas significativas nos valores médios das contagens totais dos leucócitos do grupo infectado em relação ao grupo controle. Apenas oscilações nas contagens totais de leucócitos de ambos os grupos.

**Gráfico 12 – Valores médios absolutos das contagens totais dos leucócitos dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



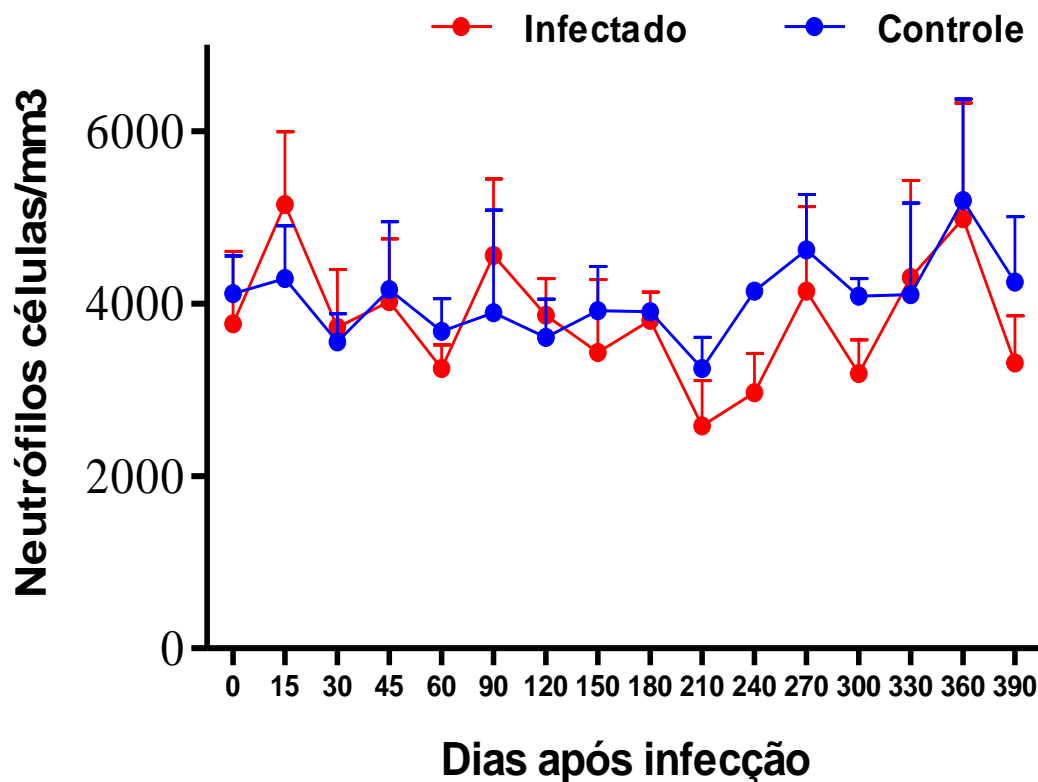
## 6.5 Contagem diferencial

### 6.5.1 Neutrófilos

No **GRÁFICO 13** encontram-se as contagens absolutas dos números médios dos neutrófilos dos grupos infectado e controle durante a infecção com metacercárias de *Fasciola hepatica* em ovinos da raça Santa Inês.

Durante todo o período experimental não houve diferenças estatísticas significativas nas contagens de neutrófilos entre os grupos, embora tenha ocorrido aos 15 e 90 dpi, aumento expressivo nas contagens dos neutrófilos do grupo infectado.

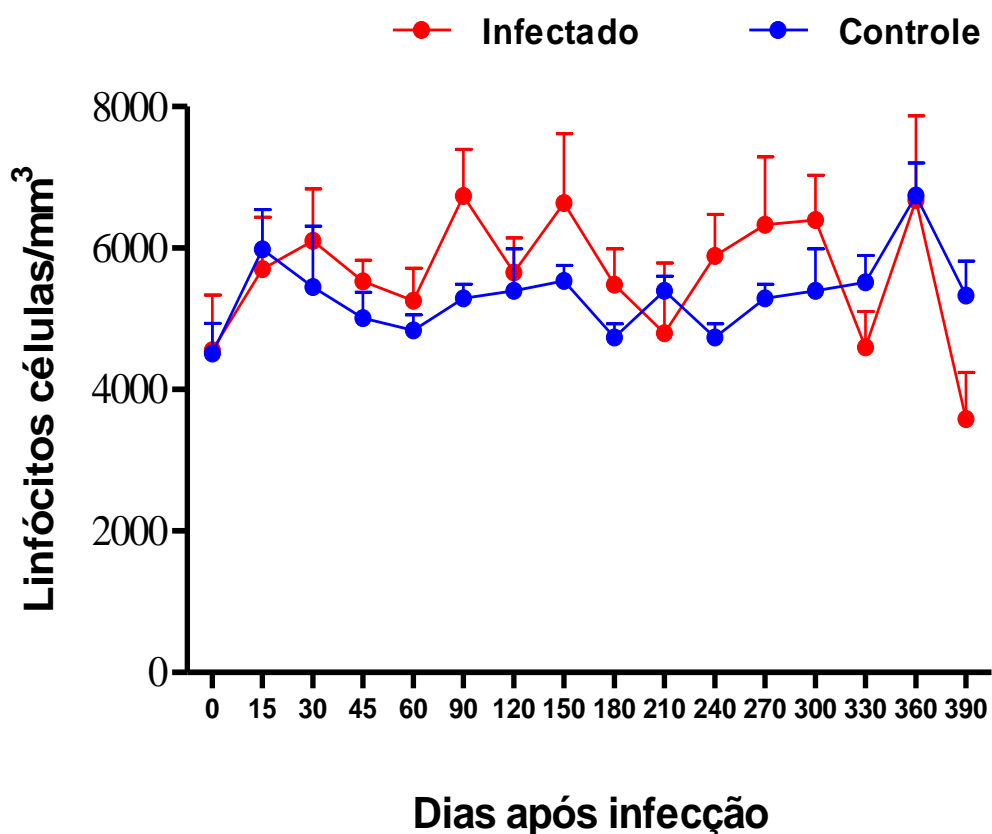
**Gráfico 13 – Valores médios absolutos de neutrófilos dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



### 6.5.2 Linfócitos

No **GRÁFICO 14** encontram-se as contagens absolutas dos números médios dos linfócitos dos grupos infectado e controle. Durante todo o período experimental não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas contagens dos linfócitos do grupo infectado em relação ao grupo controle.

**Gráfico 14 – Valores médios absolutos de linfócitos dos ovinos da raça Santa Inês controles e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***

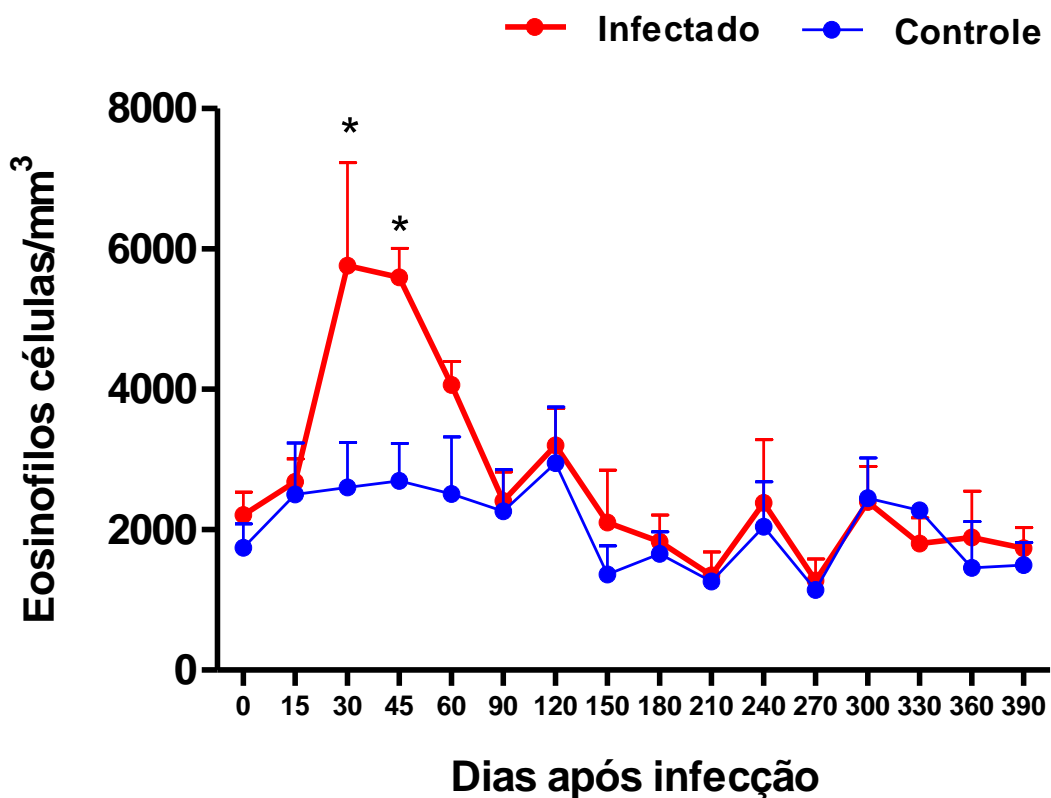


### 6.5.3 Eosinófilos

No **GRÁFICO 15** encontram-se os valores médios das contagens absolutas de eosinófilos dos grupos infectado e controle observados no estudo experimental com ovinos da raça Santa Inês infectados com metacercárias de *Fasciola hepatica*.

O grupo de ovinos infectados apresentou contagens superiores de eosinófilos na maioria do período experimental. Observou-se que o grupo infectado apresentou diferenças estatísticas nessas contagens em relação ao controle aos 30 e 45 dias após infecção ( $p < 0.05$ ).

**Gráfico 15 – Valores absolutos médio de eosinófilos dos ovinos da raça Santa Inês controle e infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica***



\*  $p \leq 0,05$  representa as diferenças estatísticas nas contagens médias absolutas de eosinófilos entre os grupos infectado e controle

#### **6.5.4 Monócitos**

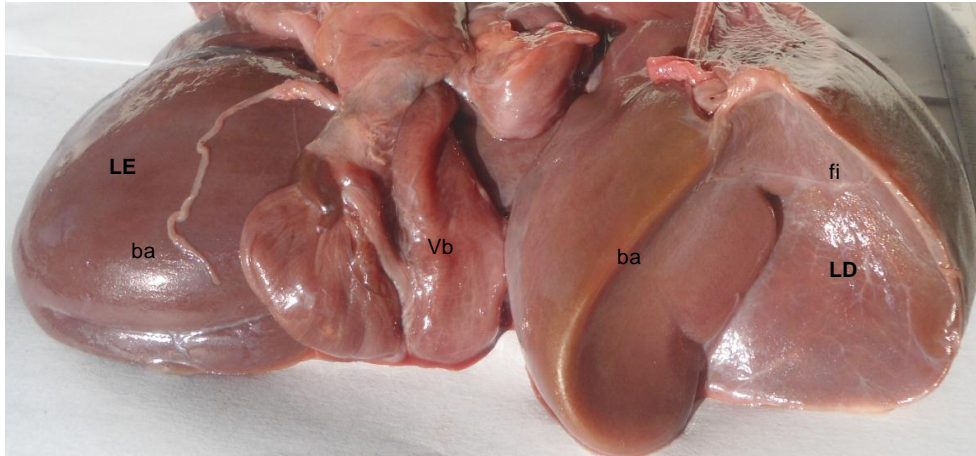
Durante todo o período experimental não foram verificadas diferenças estatísticas entre o grupo infectado e controle nas contagens de monócitos.

### **6.6 Necropsia**

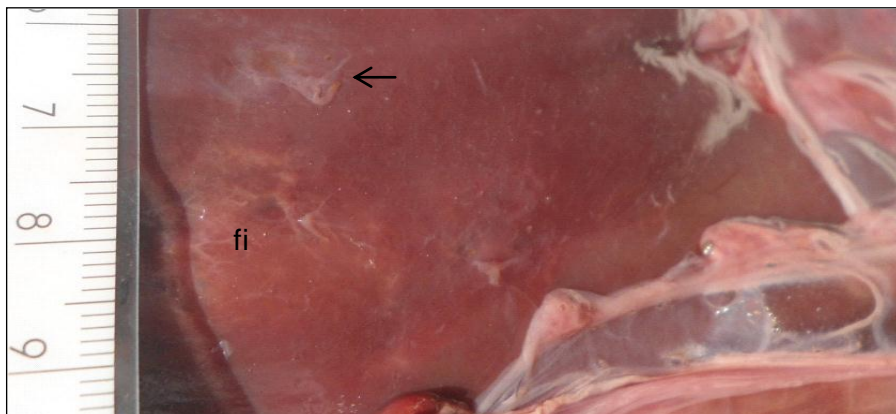
#### **6.6.1 Avaliação macroscópica**

Aos 300 e 330 dpi, os ovinos números 4 e 5 morreram. Ambos os animais se apresentavam magros e desidratados. Após a realização da necropsia, observou-se, na análise macroscópica dos fígados dos ovinos 4 e 5, características comuns, como o aumento de volume do órgão, lóbulos com bordas abauladas (**FIGURA 5**), pontos hemorrágicos distribuídos difusamente pelo parênquima (**FIGURA 9**), focos de deposição de fibrina na superfície do parênquima (**FIGURA 6,7,8**), cicatriz fibrótica (**FIGURA 7**) focos de necrose com coloração avermelhada mais escura (**FIGURA 9**) e presença de parasitos adultos nos ductos biliares (**FIGURA 13**).

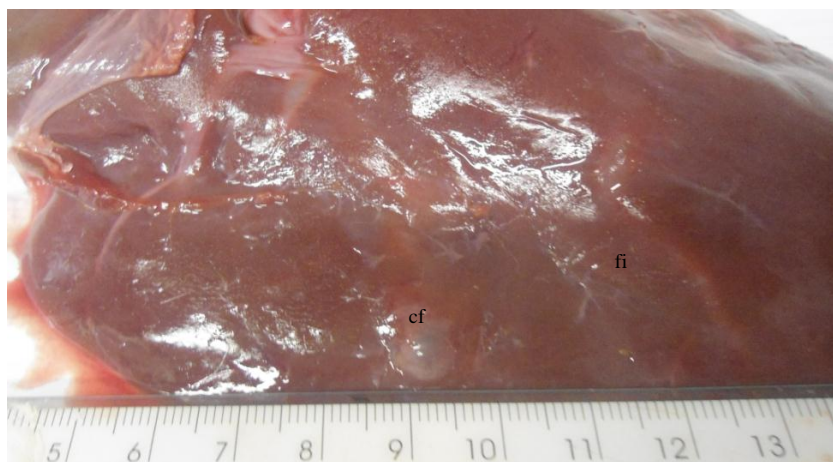
O fígado do ovino 4 apresentou lesões mais acentuadas e, além das alterações citadas, foi verificado perda da coloração e arquitetura do parênquima hepático, com a superfície paretal apresentando ruptura (**FIGURA 8**) e retração do parênquima hepático (**FIGURA 10**), presença de nódulos de coloração amarelo brancos ou vermelho escuro de consistência firme ou encapsulado no parênquima (**FIGURA 12**), os ductos biliares com dilatação da luz e espessamento da parede (**FIGURA 11**).



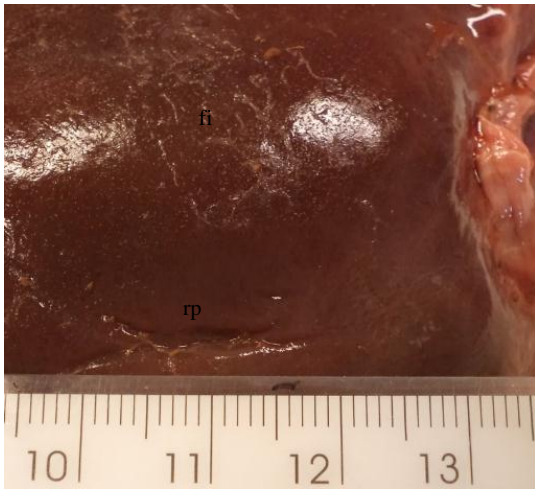
**Figura 3 – Fígado do ovino n° 5 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 300 dias de infecção. O lobo direito (LD), o lobo esquerdo (LE); bordas abauladas (ba); áreas de fibrina (fi) e vesícula biliar (Vb) Fonte: Fotografia do autor**



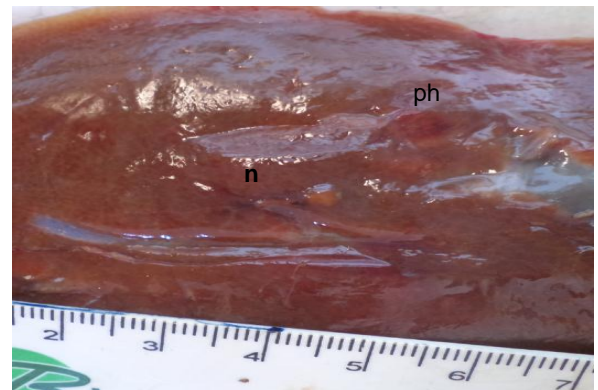
**Figura 4 – Fígado do ovino n° 5 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 300 dias de infecção. Superfície visceral com focos de fibrina (fi), e seta indica fibrose Fonte: Fotografia do autor**



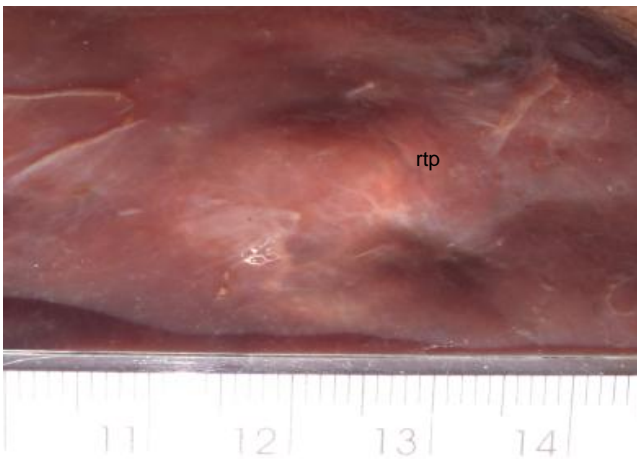
**Figura 5 – Fígado do ovino n° 5 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 300 dias de infecção. Superfície visceral com focos de fibrina (fi) e cicatriz fibrótica (cf) Fonte: Fotografia do autor**



**Figura 6 – Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 330 dias de infecção.** Apresentando áreas com deposição de fibrina (fi) e ruptura do parênquima hepático (rp). Fonte: Fotografia do autor



**Figura 7 – Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 330 dias de infecção.** Apresentando pontos hemorrágicos (ph) e focos de necrose (n). Fonte: Fotografia do autor



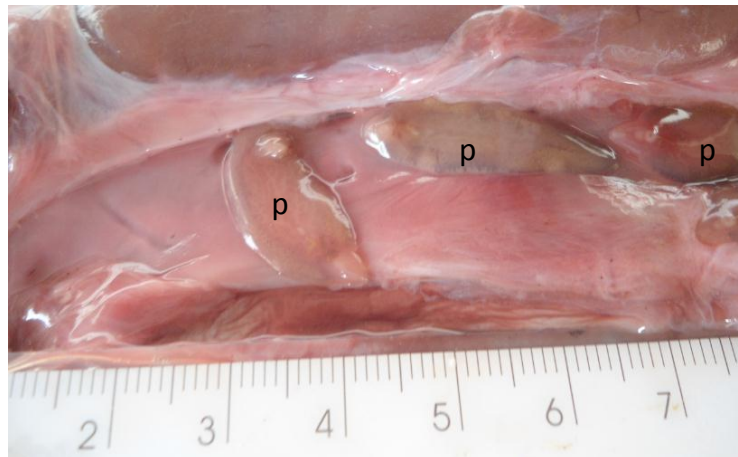
**Figura 8 – Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 330 dias de infecção.** Superfície parietal com retração do parênquima hepático (rtp). Fonte: Fotografia do autor



**Figura 9 – Fígado do ovino nº 4 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 330 dias de infecção.** Ducto biliar hiperêmico, edemaciado e dilatado. Fonte: Fotografia do autor



**Figura 10 – Fígado do ovino n° 4 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 330 dias de infecção. Superfície visceral com áreas de fibrose (setas).  
Fonte: Fotografia do autor**



**Figura 11 – Fígado do ovino n° 4 infectado com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* após 330 dias de infecção. Parasitos (p) adultos no ducto biliar dissecado. Fonte: Fotografia do autor**

### **6.7 Taxa de recuperação de *F. hepatica***

Após abertura dos ductos biliares o número de *F. hepatica* recuperados dos fígados dos ovinos 5 e 4 foram, respectivamente, 47 (31,33%) e 56 (37,33%).

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Dinâmica de eliminação de ovos de *F. hepatica* em ovinos da raça Santa Inês

Na infecção experimental dos ovinos da raça Santa Inês, o período pré-patente (PPP) variou entre 60 e 62 dias, resultado semelhante aos de Sinclair (1975) e Martínez-Pérez *et al.* (2014) que observaram PPP variando de 63 a 64 dias, mas, diferente dos observados por Presidente *et al.* (1975) e William J. Foreyt (2009), que relataram PPP entre 70 e 77 dpi. Deve-se ressaltar que a raça e o número de metacercárias utilizadas pelos autores citados foram diferentes dos utilizados nesse trabalho, o que pode ter influenciado os resultados.

As contagens de ovos nas fezes aumentou gradativamente na maioria dos animais até os 120 dpi, apresentando novo pico aos 210 dpi, mantendo-se positivos durante todo período experimental. O número de ovos eliminados variou entre os animais dentro do grupo. A variação inicial das contagens de OPG, provavelmente, foi devido ao período de migração dos estágios imaturos na cavidade abdominal, no fígado, até atingir os ductos biliares e tornarem-se maduros, pois a migração no hospedeiro não ocorre ao mesmo tempo por todos os parasitos.

Durante o estudo, dois ovinos morreram: o número cinco aos 300 dpi, apresentando 208 ovos nas contagens de OPG, e o número quatro aos 330 dpi, apresentando 1296 de OPG. Observou-se que, no dia do óbito os ovinos, apresentaram contagens de OPG distintas, não sendo possível afirmar a relação do número de ovos presentes nas fezes com a morte. Sinclair (1962) observou que, quando o pico nas contagens médias de OPG foi de 2.200, o ovino morreu aos 133 dpi; no entanto, relatou que as contagens médias de OPG eram semelhantes à de outros ovinos do mesmo grupo.

Outro fato observado durante o acompanhamento das contagens de OPG nos ovinos infectados cinco, seis, sete e oito, é que estes foram os que demonstraram menores médias de OPG ao longo do estudo. Esse fato sugere que esses animais podem apresentar maior resistência à infecção, mostrando que, dentro da mesma raça, a variação genética de cada indivíduo pode influenciar na carga parasitária.

Durante todo o período experimental avaliado não houve negatificação dos exames das fezes, mostrando a importância do acompanhamento da dinâmica de eliminação de ovos nesse estudo, demonstrando que, na natureza, os animais susceptíveis podem eliminar ovos no meio ambiente por mais de um ano, contribuindo para o aumento do número de casos positivos em regiões onde a manutenção do ciclo biológico seja possível, devido à presença de limneídeos, hospedeiro intermediário.

Além disso, a ovinocultura apresenta mercado crescente no Brasil, sendo que a raça Santa Inês lidera esse mercado e, ainda, revelou-se susceptível a *Fasciola hepatica*, apresentando eliminação de ovos contínua e progressiva, o que sugere a importância de estudar essa associação parasito-hospedeiro.

## **7.2 Exame clínico**

O quadro clínico da fasciolose é variável e depende da carga parasitária, da resposta imune do hospedeiro, da fase e da duração da infecção, da idade, e do estado nutricional (Boray 1969, Haroun e Hillyer 1986, Torgerson e Claxton 1998, Piedrafita et al. 2004, Lima et al. 2004, 2009). Os sinais clínicos observados durante o período experimental nos ovinos infectados foram edema submandibular, sensibilidade hepática dolorosa, prostração, desidratação, anemia, perda de peso e alteração de escore corporal. No entanto, nenhum destes sinais foram observados em 100% dos animais do grupo infectado, não podendo ser considerado patognomônicas para fasciolose.

A sensibilidade hepática dolorosa ocorreu em 80% dos animais, iniciando-se aos 15 dpi e sendo mais frequente, na maioria dos animais, até os 90 dpi, provavelmente devido à migração das formas imaturas no tecido hepático, levando à destruição dos hepatócitos, inflamação e necrose. Esse achado foi observado por Boray (1967) entre 56 e 70 dpi e Sinclair (1975) aos 42 dpi. Neste período, até os 90 dpi, que corresponde à fase aguda da fasciolose, houve à redução gradativa dos sinais clínicos observados para a maioria dos animais, embora alguns tenham permanecido com a sensibilidade hepática dolorosa durante todo o período, coincidindo com a localização dos parasitos adultos nos ductos biliares.

O edema submandibular foi observado em um ovino (11.1%) na fase aguda da infecção. Resultado semelhante ao obtido por Sinclair (1962) em infecção experimental e por Matanovic et al. (2007) em ovinos naturalmente infectados, que os atribuíram às migrações no parênquima hepático pelos estágios imaturos com destruição dos hepatócitos e, conseqüentemente, à redução nos níveis de albumina. Tal fato pode ter ocorrido nesse trabalho.

Aos 270 dpi, outro animal na fase crônica da doença apresentou edema submandibular, coincidindo com a presença dos parasitos nos ductos biliares. A hipoalbumemia pode ocorrer devido à presença dos parasitos adultos, especialmente em casos de infecção com alta carga parasitaria (Ibrovic & Gall-Palla 1959, Ugrin & Skovronski 1959, Sinclair 1962, Thorpe 1965, Ross *et al.* 1966). O edema submandibular verificado nesse estudo pode ser atribuído a fasciolose, uma vez que, nenhum ovino controle apresentou tal sinal clínico. A baixa ocorrência desse sinal clínico provavelmente foi devido à baixa carga parasitária, de 150 metacercárias de *F. hepatica*, utilizadas no experimento.

Prostração, caracterizada por apatia do animal, foi um sinal clínico observado em 89% dos animais durante o período experimental, sendo mais frequente na fase aguda, e em 66,6 % dos ovinos parasitados. Apesar de frequente, foi um achado transitório, não ultrapassando 15 dias na maioria dos animais. Na fase crônica, geralmente esse sinal clínico estava associado à taquicardia, taquipnéia, redução do número médio de hemácias e hemoglobina, semelhante ao demonstrado em resposta à infecção por nematóides gastrintestinais em ovinos mestiços da raça Santa Inês, onde a redução de hemácias e hemoglobina leva a hipóxia, o que contribuiu para a elevação da frequência cárdica e respiratória (Birgel 2013).

Os aumentos das frequências cardíacas e respiratórias dos ovinos infectados e controles também podem estar relacionados ao estresse causado pela contenção mecânica dos animais. No entanto, a frequência cardíaca verificada nos ovinos infectados foi superior à observada nos ovinos controles, com diferença estatística significativa. Outro fator a ser considerado segundo Meneses (2013) são pirógenos exógenos (vírus, bactérias, fungos, protozoários e antígenos) que promovem a liberação de citocinas, e/ou de pirógenos endógenos presentes em leucócitos,

macrófagos, monócitos e células de Kuppfer, que levam aos sinais clínicos como taquicardia, taquipnéia, prostração, depressão e inibição do apetite.

### 7.3 Famacha

A coloração da mucosa ocular dos ovinos infectados ao longo do período experimental variou de rosa ao rosa pálido, enquanto os ovinos controles apresentaram as mucosas variando de vermelho rosado a rosa. Essa diferença observada entre ovinos infectados em relação ao grupo controle ocorreu de forma lenta e progressiva. A explicação para essa variação inicialmente, provavelmente foi devido à hematofagia dos estágios imaturos durante a migração no parênquima hepático e à micro-hemorragia no parênquima hepático, semelhante ao demonstrado por (Dracz 2016). Posteriormente, a redução lenta e progressiva nos números de hemácia e hemoglobina, pode ter ocorrido devido à chegada dos estágios imaturos nos ductos biliares ocorrerem de forma gradativa, provocando espoliação sanguínea e levando à coloração da mucosa ocular ao rosa pálido.

Segundo Olah et al. (2015), o índice de Famacha<sup>©</sup> pode ser utilizado para prever a carga parasitária de ovinos infectados por *F. hepatica*. Mas ressaltou que o Famacha<sup>©</sup> não apresentou correlação com o OPG, apesar da forte correlação com o número de parasitos adultos recuperados no fígado. Afirmando ainda, que essas variáveis correlacionaram moderadamente com o hematócrito e, ainda segundo Mugambi et al. 1997, Vanimisetti et al. 2004, e também Olah et al. 2015, outros fatores estariam relacionados, como a idade, o sexo, a raça e o estado fisiológico.

Os resultados do presente estudo revelam que esse método não é confiável para o acompanhamento e controle dos ovinos infectados por *F. hepatica*, pois, a redução das hemácias e hemoglobina ocorre de maneira lenta e progressiva na fasciolose. Muitos ovinos, quando são diagnosticados por esse método, já apresentam valores de hematócrito, contagens de hemácias e hemoglobina em níveis inferiores aos da normalidade, interferindo diretamente no tratamento dos animais parasitados.

#### **7.4 Escore de condição corporal**

No início do trabalho, os animais dos grupos controle e infectados apresentaram escore de condição corporal (ECC) semelhante, nível 3, ou seja, médio. ECC 3 é caracterizado por cobertura muscular suave com grupos de músculos à vista. Os processos dorsais são pouco visíveis; as costelas, quase cobertas; os processos transversos pouco aparentes, sem a presença de camadas de gordura; e a superfície do corpo é macia e a pele flexível (podendo ser levantada com facilidade).

A partir dos 15 dpi, houve diminuição gradativa do ECC até os 120 dpi, quando os animais atingiram o ECC 2,5 (entre magro e médio), sugerindo que, na fase aguda, existe maior gasto das reservas teciduais, especialmente de gordura e de músculos, para a manutenção da infecção. Resultado semelhante foi obtido por Sinclair (1975), que observou, aos 64 dpi, perda da condição corporal nos ovinos experimentalmente infectados por *F. hepatica* e que, ao longo do período experimental, a perda tornou-se evidente. A condição corporal dos ovinos infectados durante todo o experimento foi inferior à verificada nos ovinos controles.

Segundo Dixit et al. (2008), uma das principais cisteíno proteases secretada pelos parasitos, a catapsina L, também participa na aquisição de nutrientes pelo processo de catabolização de proteínas do hospedeiro para peptídeos absorvíveis, contribuindo para menor condição corporal, o que também pode ter contribuído para condição corporal inferior dos ovinos infectados em relação aos controles.

Esses resultados diferem de Martinez-Perez et al. (2014), que não observaram diferença estatística na condição corporal entre os grupos de ovinos infectados e controles ao longo do período avaliado.

#### **7.5 Desenvolvimento ponderal**

Durante o período experimental, o ganho de peso dos ovinos infectados, a partir de 30 até 180 dpi, foi discreto, apenas 3,4 kg, enquanto os controles, no mesmo intervalo, ganharam 12,6 kg, quase quatro vezes mais do que o observado nos ovinos infectados.

Esses achados sugerem que a presença dos estágios imaturos migrando no parênquima hepático e o processo inflamatório desenvolvido no fígado podem ter contribuído para o ganho de peso inferior dos ovinos infectados em relação aos controles. Esses dados estão de acordo com vários autores, como Dargie et al. (1979), que relatam ganhos de peso significativamente menores em ovinos infectados com 45 parasitos adultos, e com os de Diiwel et al. (1972), que demonstraram que 38 vermes são capazes de causar perda de peso. Altas cargas parasitárias, por exemplo, acima de 350 vermes, podem causar grave perda de peso e morte em ovinos adultos (Boray 1969, Berry & Dargie 1976, Hawkins & Morris 1978, Hawkins 1984).

Posteriormente, dos 120 até 390 dpi, verificou-se ganho de peso moderado dos ovinos infectados em relação aos controles. O ganho de peso verificado após a fase aguda sugere a recuperação do parênquima hepático, do processo inflamatório causado pelas migrações dos estágios imaturos, pois percebeu-se que, até este momento, os ovinos infectados não apresentavam ganho de peso significativo. Interessante ressaltar que, no dia 0, a pesagem média revelou 24,5 Kg para ambos os grupos; ao final do experimento, a pesagem final realizada aos 390 dpi revelou que os ovinos infectados ganharam 10,5 Kg, ficando com a média final de 35 Kg, enquanto o grupo controle ganhou 25,5 Kg, ficando com a média final de 50 Kg. A diferença de ganho de peso final do grupo infectado em relação ao controle são de 15 Kg, ou seja, os ovinos infectados ganharam peso ao longo do experimento, mas, devido à presença da *F. hepatica*, os animais não conseguiram expressar o seu potencial máximo de ganho de peso. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Boray (1967) que, trabalhando com ovinos infectados com 200 metacercárias de *F. hepatica*, observou ganho médio de 5 Kg ao longo dos 175 dias; com 500 metacercárias o ganho médio foi 4,68 Kg em 84 dias; com 1.000 a 2.000 metacercárias a perda de peso iniciou entre 14 e 28 dpi e o ganho de peso ocorreu entre 49 e 56 dpi; e com 4.000 – 10.000 metacercárias a perda de peso começou a partir de 21 dpi; e com 56 dpi, a perda de peso chegou a 9 Kg e a perda máxima observada no experimento foi de 18 Kg.

Os mecanismos que podem afetar o ganho de peso dos ovinos infectados são vários, na maioria das vezes somam-se e potencializam seus efeitos sendo difícil

separá-los. Berry & Dargie (1976) observaram correlação entre o aparecimento e a gravidade da apatia com a ingestão de alimentos e com o desenvolvimento da anemia; além disso, observaram aumento dos níveis de uréia plasmática, indicando a desaminação de aminoácidos aumentada dentro do intestino, coincidente com o aumento dos níveis de uréia no sangue, sugerindo perda de proteína muscular.

Sykes et al. (1980) relatam que, a hipertrofia hepática, em consequência da migração dos parasitos imaturos, a ingestão de proteínas pelos adultos, o desvio fisiológico de aminoácidos para atender aos requisitos de síntese de proteínas no fígado, na medula óssea e tecido linfoide, decorrentes das estimulações antigênicas, e a passagem de proteínas do sangue para o intestino, reduz a disponibilidade de ácidos aminados para crescimento, ganho de peso, lã e leite.

Portanto, o ganho de peso reduzido em ovinos tem duas causas aparentes: conversão alimentar reduzida e anorexia (inapetência), que pode ser influenciada pela carga parasitária (Sinclair 1975, Berry & Dargie 1976, Hawkins & Morris 1978, Dargie et al. 1979, Sykes et al. 1980, Ferre et al. 1994). O mecanismo que causa a redução do apetite não é bem conhecido. Em infecções experimentais com dose única, a anorexia coincidiu com a entrada dos parasitos nos ductos biliares entre 42 e 49 dpi (Berry & Dargie 1976, Dargie et al. 1979, Sykes et al. 1980, Ferre et al. 1994).

Nesse trabalho o ganho de peso dos ovinos infectados foi influenciado significativamente pela infecção por *F. hepatica*, demonstrando que o parasitismo é um fator limitante para o ganho de peso.

## **7.6 Perfil hematológico**

Em relação ao perfil hematológico, foram observados valores médios menores de hemácias, hemoglobina e hematócrito a partir dos 15dpi nos ovinos infectados em relação aos animais controles e que persistiram durante todo período experimental. Ao se observar esses parâmetros em conjunto, pode-se verificar queda mais evidente dos 30 a 120 dpi, período que coincide com a migração dos estágios imaturos no parênquima hepático e com a fase aguda. Essas alterações hematológicas observadas nesse trabalho estão de acordo com a literatura, sendo

considerada uma característica importante da doença (Holmes et al. 1968, Saleh 2008, Flynn et al. 2010).

A anemia descrita na fasciolose pode ser devido a uma perda anormal de células vermelhas, como resultado da migração do parasito pelo parênquima hepático, que lesiona as células, os vasos, e também devido aos hábitos de alimentação dos parasitos, conforme descrito por Dargie et al. (1979), que atribuiu a anemia na fase inicial da infecção à hemorragia intra-hepática, devido à migração dos estágios imaturos. Martinez-Pérez *et al.* (2014) demonstraram que ovinos infectados por *F. hepatica* apresentavam redução do hematócrito aos 14 dpi, chegando a 17%; aos 84 dpi, a anemia ainda persistia, embora o valor médio de hematócrito tenha sido de 24%. Boray (1967) observou que anemia estava associada à redução de hemácias, que ocorreu entre 28 a 35 dpi. Por outro lado, Sinclair (1962) mostrou que ovinos infectados não apresentavam redução de eritrócitos até os 56 dpi. Mekrouk *et al.* (2007) não verificaram redução no número de eritrócitos dos ovinos infectados em relação ao controle durante o período estudado. As diferenças observadas entre os estudos podem ser devido à raça, à idade dos animais, à infectividade, à genética, à localização dos estágios imaturos, à capacidade eritrocítica de cada animal e ao período de migração dos estágios imaturos na cavidade abdominal e no fígado, pois o número de metacercárias utilizadas pelos autores foi semelhante à utilizada nesse estudo. O aumento observado nos valores médios dos eritrócitos dos ovinos infectados em alguns momentos da infecção pode ser explicado devido à resposta do sistema hematopoético à infecção, na tentativa de repor o número de eritrócitos (Sinclair 1962, Boray 1967, Martinez-Pérez *et al.* 2014).

As mortes de dois ovinos aos 300 dpi e 330 dpi têm em comum os valores médios de hemoglobina, 10,5% e 11,2 %, valores bem inferiores aos ovinos infectados e controles no mesmo intervalo. Esses resultados fortalecem a hipótese que a espoliação sanguínea realizada pelos parasitos pode ter contribuído para as mortes ocorridas no presente estudo. No entanto, o aumento nos valores médios de hemoglobina verificado nos ovinos infectados aos 330 e 360 dpi sugere que o sistema hematopoiético ainda consegue repor as células perdidas em consequência da espoliação sanguínea.

Hawkins (1984) também observou que os ovinos que apresentassem o valor médio de hematócrito inferior a 15 % morriam, sugerindo que o hematócrito poderia prever a carga parasitária e o prognóstico do animal.

Durante a revisão de literatura, constatou-se que, os trabalhos realizados sobre o perfil hematológico com ovinos infectados experimentalmente ou naturalmente por *Fasciola hepatica*, apresentam informações fragmentadas, incompletas. Este é o primeiro estudo que realiza o acompanhamento periódico do hemograma completo de ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados por *F. hepatica*.

### **7.6.1 Volume corpuscular médio**

Os valores médios dos volumes corpusculares de ambos os grupos permaneceram dentro da normalidade, 23 a 48 fentolitro (fl), durante todo o período experimental. As médias verificadas nos ovinos infectados foram superiores às médias dos ovinos não infectados. Além disso, as médias dos ovinos não infectados não oscilaram durante todo período experimental, sendo o valor médio verificado no dia 0, 31 fl, próximo do observado aos 390 dpi, 33,5 fl.

Nesse estudo, o volume corpuscular médio dos ovinos infectados aumentou, a partir dos 15 dpi até os 60 dpi, e com diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos ovinos não infectados na maioria dos intervalos. O aumento discreto, porém progressivo, no VCM dos ovinos infectados nesse estudo, indica redução no número de hemácias na circulação e a liberação de reticulócitos pela medula óssea. Coincidindo com o período da migração dos estágios imaturos no parênquima hepático, com a presença dos parasitos adultos nos ductos biliares realizando espoliação sanguínea. Esses resultados demonstram que anemia provocada por *F. hepatica* foi do tipo normocítica normocrômica e regenerativa. De maneira semelhante, outros autores, como Sykes et al. (1980), também encontraram baixos valores de hemácias e hemoglobina, com aumento no VCM dos ovinos infectados na fase subclínica em relação aos não infectados, mas não relatam em qual momento ocorreu o aumento e nem os valores médios. Matanovic et al. (2007) verificaram que, nos ovinos infectados, os valores médios do VCM, 33,94 fl, foram

superiores aos verificados no grupo controle, 30,75 fl, e com diferença estatística. No entanto, os valores de ambos os grupos estavam dentro da normalidade e no estudo não foi apontado em quais dias ocorreu à alteração.

### **7.6.2 Concentração média de hemoglobina**

Os valores da concentração média de hemoglobina (CMH) nesse estudo permaneceram dentro dos parâmetros de normalidade durante todo o experimento, tanto para os ovinos infectados como para os ovinos não infectados. Esse achado sugere que hemácias foram substituídas por reticulócitos, que são hemácias jovens que, no entanto, são maiores e possuem a capacidade de sintetizar 20% a mais de hemoglobina que a hemácia madura. De maneira semelhante Matanovic *et al.* (2007) relataram que o valor médio de CMH de ambos os grupos, infectados e controle, apresentaram valores semelhantes e dentro da normalidade em infecção natural por *F. hepatica*. No entanto, Martinez-Pérez *et al.* (2014) observou que as concentrações médias de hemoglobina verificadas nos ovinos infectados foram superiores às encontradas nos ovinos não infectados e aumentaram a partir de 28 dpi.

### **7.6.3 Concentração de hemoglobina corpuscular média**

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi semelhante entre os animais dos grupos infectado e controle durante o estudo. Embora tenha ocorrido variações das concentrações durante o período experimental, não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos, diferindo dos resultados de Matanovic *et al.* (2007), que relataram que o CHCM nos ovinos infectados foram menores que o verificado nos ovinos não infectados. No entanto, Martinez-Pérez *et al.* (2014) observaram que o CHCM nos ovinos infectados foram superiores aos dos animais controles.

#### **7.6.4 Plaquetas**

A partir dos 15 dpi, ocorreu redução na quantidade de plaquetas circulantes à medida que o período de infecção foi evoluindo, o que sugere o deslocamento dessas células para o local de migração do parasito para bloquear a perda de sangue devido ao rompimento de vasos sanguíneos provocado pelo hematofagismo dos estágios imaturos, ou pela redução na produção de plaquetas pela medula óssea. Os mecanismos para explicar a alteração no número de plaquetas circulantes não são bem conhecidos em ovinos infectados com *F. hepatica*, mas, em ratos, Baeza *et al.* (1994) demonstraram a redução no número médio de plaquetas aos 7 dpi, e atribuíram essa observação, à capacidade do parasito em modular a resposta inflamatória, visto que os ratos que foram vacinados com adjuvante completo de Freund's na região peritoneal antes da infecção por *F. hepatica* não apresentaram redução no número médio de plaquetas.

#### **7.6.5 Leucograma**

Neste estudo, verificou-se que a infecção experimental dos ovinos induziu aumento nas contagens médias dos leucócitos totais em relação ao grupo não infectado a partir dos 15 dpi, com pico aos 30 dpi. Os níveis continuaram mais elevados em relação ao grupo controle até os 150 dpi, e diminuição nas contagens totais dos leucócitos do grupo infectado em relação ao grupo controle foram evidenciada até os 390 dpi. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Também foi observado um aumento nas médias dos leucocitos diferenciais como os neutrófilos, linfócitos e eosinófilos em relação ao grupo controle, com oscilações desses valores durante todo o período experimental. Esses achados coincidem com o deslocamento dos estágios imaturos através das camadas do intestino para a cavidade abdominal, com a penetração no parênquima hepático, com a destruição de hepatócitos e a liberação de substâncias antigênicas, como o estabelecimento da inflamação no fígado. Sendo que as reduções dessas células no sangue periférico dos ovinos infectados nesse estudo, em relação ao grupo controle, provavelmente devido à migração dessas células para o fígado como descrito por

vários autores (Sinclair 1962, Meeusen et al. 1995, Tliba et al. 2000, Matanovic et al. 2007).

Além dessa capacidade da *F. hepatica* em provocar oscilações nos leucócitos do sangue periférico quando se estabelece no fígado, auxiliado pela secreção de metabólitos, como complexas proteínas, que ajudam também na aquisição de requisitos nutricionais, ela também possui a capacidade de interferir nas células do sistema inute do hospedeiro realizando modulação e/ou evasão (Flynn et al. 2010). Penny et al. (1996) relataram que as alterações nas contagens diferenciais de leucócitos pode ser um meio de defesa do organismo contra a *Fasciola*, os efeitos obstrutivos, e/ou devido à lesão mediada por complexo antígeno-anticorpo na medula óssea.

Embora não tenha sido encontrado na literatura acompanhamento do perfil hematológico de ovinos da raça Santa Inês por um longo período, como o realizado nesse estudo, durante a infecção com *Fasciola hepatica*. Encontra-se na literatura dezenas de trabalhos sobre alterações no perfil hematológico de ovinos infectados com *F. hepatica*, com resultados que coincidem ou divergem dos encontrados nesse trabalho, provavelmente, devido à influência de raça, de idade, de carga parasitária e do período de acompanhamento da infecção.

Com relação à variação dos leucócitos diferenciais, Chauvin et al. (1995) relataram aumento na contagem total de leucócitos em ovinos infectados com 230 metacercárias a partir da 3ª e 5ª semana após infecção, mas não observaram alterações nem variações em neutrófilos, monócitos ou linfócitos. Entretanto, os eosinófilos começaram a aumentar a partir da 2ª e 3ª semana, com picos de eosinofilia nas 4ª, 5ª e 6ª semanas e novamente nas 9ª, 10ª e 11ª semanas. Segundo os autores, esses picos correlacionam-se com a fase de migração dos estágios imaturos pelo parênquima hepático e com a presença das formas adultas nos ductos biliares. A eosinofilia também foi descrita por Haçariz et al. (2009) em ovinos “Texel x Cheviot” a partir da 3ª semana pós infecção.

A eosinofilia é um dos achados mais marcantes descritos na fasciolose. Entretanto, deve-se ressaltar que ocorre na maioria das infecções helmínticas (Marques Junior et al. 1983).

A contagem absoluta de eosinófilos dos ovinos infectados no presente estudo, aumentou a partir dos 15 dpi, com diferença estatística significativa aos 30 e 45 dpi, período coincidente com pico de eosinofilia. Esse aumento significativo antes do período pré-patente, que ocorreu em torno de 60 dpi, pode estar relacionado à migração dos parasitos no parênquima hepático, e a presença dos adultos nos ductos biliares. Os resultados desse trabalho, estão de acordo com os de Sinclair (1975), Presidente et al. (1975) Chauvin et al. (1995) e Zhang et al. (2005). Já as reduções no número de eosinófilos no sangue periférico dos ovinos infectados nesse estudo, em relação aos não infectados, pode estar relacionada com a migração dessa célula para o sítio inflamatório por processo quimiotático. Como sugerido por Ruston & Murray (1977), Rojas et al. (2015), que relataram predominância de eosinófilos em relação a neutrófilos e a macrófagos em lesões nos fígados de ovinos infectados com *F. hepatica*. Além disso, a eosinofilia tem sido relatada como sendo proporcional ao grau de estimulação antigênica (Escamilla et al. 2016).

Nesse trabalho não houve alterações significativas nas contagens de monócitos e basófilos entre os ovinos infectados e os ovinos não infectados, resultados semelhantes aos de Matanovic et al. (2007).

## **7.7 Avaliação macroscópica dos fígados**

Neste trabalho, os achados macroscópicos dos fígados de dois ovinos que morreram na fase crônica da infecção indicaram a gravidade da doença, confirmada pela hepatomegalia, pelos lóbulos com bordas abauladas, pelos pontos hemorrágicos distribuídos difusamente pelo parênquima, por focos de deposição de fibrina na superfície do parênquima, por focos de necrose com coloração avermelhada mais escura e pela presença de parasitos adultos nos ductos biliares. Observou-se maior intensidade de necrose contínua na superfície parietal em relação à superfície visceral; isso se deve principalmente a migração pelos estágios imaturos. Esses resultados são semelhantes aos observados por (Sinclair 1967, Dow et al. 1968, Rushton & Murray 1977, Bostelmann et al. 2000).

A migração dos parasitos jovens pelo parênquima hepático é favorecida pelos produtos excreto-secretados, além da ação mecânica realizada por ventosas e

espinhos presentes no tegumento, causando quadro de necrose hepatocelular. As áreas lesionadas são substituídas por tecido conjuntivo que produz cicatrizes fibrosas, principalmente na cápsula hepática (manchas leitosas), apresentando características de áreas pálidas, assim como observado por Dow et al. 1968, Rushton & Murray 1977. Esses fatores também contribuem para a hiperplasia dos ductos biliares verificada nesse estudo, achados similares aos estudos realizados em ovinos por outros autores como Sinclair 1967, Dow et al. 1968, Boray 1969, Behm & Sangster 1999, Bostelmann et al. 2000.

Os pontos hemorrágicos distribuídos no parênquima hepático e a deposição de fibrina observada nesse estudo confirmam que tais lesões são causadas pela migração, pela alimentação do parasito e pelo surgimento de áreas de lesão, semelhante aos estudos de (Sinclair 1967, Dow et al. 1968, Boray 1969, Behm & Sangster 1999, Bostelmann et al. 2000).

A fibrose hepática observada nesse estudo é resultado da infecção por *F. hepatica*, visto que a alteração pode ser promovida pelo acúmulo progressivo de componentes da matriz extracelular (MEC), resultando em substituição da arquitetura normal do órgão e comprometimento da atividade funcional do fígado, como descrito por (Bataller & Brenner 2005, Marcos et al. 2011).

Esses achados dão suporte às manifestações clínicas apresentadas pelos ovinos, demonstrando que a infecção experimental com 150 metacercárias de *F. hepatica* foi capaz de causar lesões no fígado, e conseqüentemente a morte de alguns ovinos da raça Santa Inês. A associação dos sinais clínicos com esses achados macroscópicos confirma que os animais morreram na fase crônica da infecção.

## 8 CONCLUSÕES

- O período pré-patente em ovinos da raça Santa Inês infectados com 150 metacercárias variou de 60 a 62 dias.
- Após período pré-patente, os ovinos Santa Inês infectados por *F. hepatica* eliminaram ovos nas fezes por mais de 12 meses.
- Ovinos Santa Inês com fasciolose apresentam sensibilidade hepática dolorosa durante a palpação hepática, sendo importante a realização desse procedimento durante a avaliação física para auxílio no diagnóstico.
- Aumento da frequência cardíaca e respiratória por minuto, associadas com a palidez da mucosa ocular, são observados nos ovinos com fasciolose, tornando importante a avaliação cardiorrespiratória no auxílio do prognóstico.
- A utilização do método Famacha©, sem associação com outros parâmetros clínicos não é confiável para o acompanhamento e controle dos ovinos infectados por *F. hepatica*.
- Os sinais clínicos são mais evidentes entre os 15 e 120 dias após infecção, sugerindo ser essa a fase aguda da infecção.
- Ovinos Santa Inês infectados com 150 metacercárias de *F. hepatica* apresentam ganho de peso inferior aos não infectados.
- O hemograma dos ovinos Santa Inês com fasciolose demonstra anemia normocítica, normocrômica e regenerativa, com leucocitose por neutrofilia e eosinofilia na fase aguda e linfocitose na fase crônica.

- A infecção com 150 metacercárias de *F. hepatica* causa morte dos ovinos da raça Santa Inês na fase crônica.
- Os fígados dos ovinos Santa Inês experimentalmente infectados por *F. hepatica* apresentam borda abaulada, aumento de tamanho, fibrose, necrose e fibrina aderida à cápsula hepática.
- A taxa de recuperação de *F. hepatica* em ovinos Santa Inês infectados com 150 metacercárias está em torno 34%.

## 9 REFERÊNCIAS

ABIDU, M.; SCHERER, P. O.; CARNEIRO, V. S. **Estudo comparativo entre técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos.** Rev. Bras. Cienc. 1996, v.3 p.1-3.

ANDREWS, S. J. **The Life Cycle of *Fasciola hepatica*.** In: Dalton, J. P. Fasciolosis. Dublin: CABI Publishing 1999, p. 1-29.

ANIL, M. H.; FORBES, J. M. **Feeding in sheep during intraportal infusions of short-chain fatty acids and the effect of liver denervation.** J. Physiol. 1980, 298, p. 407–414.

BAEZA, E.; POITOU, I.; BOULARD, C. **Influence of pro-inflammatory treatments on experimental infection of rats with *Fasciola hepatica*: changes in serum levels of inflammatory markers during the early stages of fasciolosis.** Res Vet Sci. 1994, Sep, 57(2): p. 180-7.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. **Liver fibrosis.** J Clin Invest. 2005 Feb, 115(2), p. 209-18.

BENDEZÚ, P.; LANDA, A. **Distomatosis hepática.** Epidemiologia y control. Bol. IVITA 1973, 14:1-32.

BEHM, C. A.; SANGSTER, N. C. **Pathology, pathophysiology and clinical aspects.** In: Dalton, J.P. (Ed.), Fasciolosis. CABI Publishing, Oxon, UK, 1999, p. 185–224.

BENNEMA, S. C.; SCHOLTE, R. G. C.; MOLENTO, M. B.; MEDEIROS, C.; CARVALHO, O. S. ***Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2014 Jan-Feb; 56(1): 35-41.

BERNARDO, C. C.; CARNEIRO, M. B.; AVELAR, B. R.; DONATELE, D. M.; MARTINS, I. V. F.; PEREIRA, M. J. S. **Prevalence of liver condemnation due to**

**bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses.** Rev Bras Parasitol Vet. 2011 Jan-Mar; 20(1): 49-53.

BERRY, C. I.; DARGIE, J. D. **The role host nutrition in the pathogenesis of ovine Fascioliasis.** Veterinary Parasitology 1976, Vol.2(4), p.317-332.

BIRGEL, D. B. **Estudo da anemia em ovinos decorrente a verminose gastrointestinal.** 2013. Tese apresentada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2013.

BORAY, J. C. **Studies on experimental infection with *Fasciola hepatica* with particular reference to acute fascioliasis in sheep.** Ann Trop Med Parasitol. 1967, Dec; 61(4): 439-50.

BORAY, J. C.; HAPPICH, F. A. **Standardised chemotherapeutical tests for immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep.** Aust Vet J. 1968, Feb; 44(2):72-8.

BOSTELMANN, S. C. W.; LUZ, E.; THOMAZ SOCCOL, V.; CIRIO, S. M. **Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*.** Archives of Veterinary Science 2000, v.5, p.95-100.

BRUNA, L. B. **Diversidade genética de populações de ovinos Santa Inês no Meio-Norte do Brasil com marcadores de base única (SNPs).** 2015. Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, 2015.

CALDAS, W. S.; LIMA, W. S.; CURY, M. C.; MALACCO, M. A. F.; SILVA, R. S. **Prevalência de *Fasciola hepatica* em bovinos de algumas mesorregiões do Estado de Minas Gerais.** In: IX SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. **Anais.** Campo Grande, 1995.

CANCELA, M.; ACOSTA, D.; RINALDI, G.; SILVA, E.; DURÁN, R.; ROCHE, L.; ZAHA, A.; CARMONA, C.; TORT, J. F. **A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica***. *Biochimie*. 2008 Oct;90(10): 1461-75.

CHAUVIN, A.; BOUVET, G.; BOULARD, C. **Humoral and cellular immune response to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep**. *Int J Parasitol*. 1995 Oct; 25(10): 1227-41.

COELHO, L. H. L. **Variação populacional e Dinâmica de Infecção de *Lymnaea sp.* por *F. hepatica* no município de Itajubá, MG**. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000. 66p. (Dissertação, mestrado em parasitologia), 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, Brazil**. *J Helminthol*. 2003 Mar;77(1): 7-10.

COELHO, L. H. L. ***Lymnaea columella*: Dinâmica de populações em Itajubá, MG, e susceptibilidade à infecção por *Fasciola hepatica* em associações simpátricas e alopátricas entre parasito e hospedeiro**. 2008. 110 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DACAL, A. R. C. **Susceptibilidade e mortalidade de *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* (SAY, 1817) exposta à infecção por miracídios de *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758)**. 1979. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1979.

DACAL, A. R.; COSTA, H. M.; LEITE, A. C. **Susceptibility of *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* (Say, 1817) exposed to infection by miracidia of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1988, v. 30, n. 5, p.361-369.

DAWES, B; HUGHES, D. L. **Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts.** Advances in Parasitology 1964, Volume 2, p. 97–168.

DARGIE, J. D.; BERRY, C. I.; PARKINS, J. J. **The pathophysiology of ovine fascioliasis: studies on the feed intake and digestibility, body weight and nitrogen balance of sheep given rations of hay or hay plus a pelleted supplement.** Res Vet Sci. 1979, May;26(3): 289-95.

DARGIE, J. D. **The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep.** Int J Parasitol. 1987 Feb;17(2): 453-63.

DIXIT, A. K.; DIXIT, P.; SHARMA, R. L. **Immunodiagnostic/protective role of Cathepsin L cysteine proteinases secreted by *Fasciola* species.** Vet Parasitol. 2008 Jul 4; 154(3-4): 177-84.

DOW, C. J. G.; ROSS, J. G.; TODD, J. R. **The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep.** Parasitology 1968, Feb;58(1): 129-35.

DRACZ, R. M.; LIMA, W. D. S. **Autochthonous infection of buffaloes and cattle by *Fasciola hepatica* in Minas Gerais, Brazil.** Rev Bras Parasitol Vet. 2014 Jul-Sep; 23(3):413-6.

DRACZ, R. M.; RIBEIRO, V. M. A.; PEREIRA, C. A. J.; LIMA, W. D. S. **Ocorrência de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Linnaeus, 1766) em Minas Gerais, Brasil.** Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2016, July/Sept vol.25 no. 3.

ESCAMILLA, A.; BAUTISTA, M. J.; ZAFRA, R. ; PACHECO, I. L.; RUIZ, M. T.; MARTÍNEZ-CRUZ, S.; MÉNDEZ, A.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; MOLINA-HERNÁNDEZ, V.; PÉREZ, J. ***Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep.** Vet Parasitol. 2016 Jan 30;216:84-8.

FARIA, N. R. **Prevalência e dinâmica da infecção por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1975) em bovinos, no município de Itajubá- Minas Gerais.** 2000.

73 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

FARIA, R. N.; CURY, M. C.; LIMA, W. S. **Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in Brazilian cattle.** *Revue Méd. Vét.*, 2005, 156, 2, p. 85-86.

FARIA, R. N.; CURY, M.C.; LIMA, W.S. **Concordância entre duas técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2008, vol.60, n.4.

FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH, FAO. 2013. **In vivo conservation of animal genetic resources.** *FAO Animal Production and Health Guidelines*, n. 14, Roma, 2013.

FERRE, I.; BARRIO, J. P.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; ROJO-VAZQUEZ, F. A. **Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L.** *Vet Parasitol.* 1994 Oct;55(1-2):71-9.

FERRE, I.; LÓPEZ, P.; GONZALO-ORDEN, M.; JULIAN, M. D.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. **The effects of subclinical fasciolosis on hepatic secretory function in sheep.** *Parasitol Res.* 1995;81(2):127-31.

GIRÃO, E. S.; UENO, H. Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 8, p. 905-912, 1985.

HAÇARIZ, O.; SAYERS, G.; FLYNN, R. J.; LEJEUNE, A.; MULCAHY, G. **IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep.** *Parasite Immunol.* 2009 Oct;31(10):613-22.

HAROUN, E. T.; HILLYER, G. V. **Resistance to fascioliasis: a review.** Vet Parasitol. 1986 Mar;20(1-3):63-93.

HAWKINS, C. D.; MORRIS, R. S. **Depression of productivity in sheep infected with *Fasciola hepatica*.** Vet. Parasitol. 1978 Dec 4, p. 341–351.

HAWKINS, C. D. **Productivity in sheep treated with diamphenethide at different times after infection with *Fasciola hepatica*.** Vet Parasitol. 1984 Aug;15(2):117-23.

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

*IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2015. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2>>. Acesso em: 02 de Outubro de 2015.*

JENNINGS F.W.; MULLIGAN W.; URQUHART G.M. **Radioisotope studies on the anemia produced by infection with *Fasciola hepatica*.** Experimental Parasitology., September 1956, Pages 458-468.

KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.; GIL, S. et al. **Comparison of two coprological methods for the veterinary diagnosis of fasciolosis.** *Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2005, v.57, p.181-185.

KOLB, E. **Regulação da temperatura corpórea fisiologia veterinária** 4 ed. Editora Guanabara Koogan, 562 p., 1981

LIMA, W. S.; BARÇANTE, J. M. P.; BARÇANTE, T. A.; GUIMARÃES, M. P.; SOARES, L. R. M. **Occurrence of *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758) infection in Brazilian cattle in the State of Minas Gerais.** Rev Bras Parasitol Vet. 2009 Apr-Jun;18(2):27-30.

LUTZ, A. Sobre a ocorrência de *Fasciola hepatica* no estado do Rio de Janeiro.

**Boletim do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 9 - 13, 1921.

LUZ, E.; GAZDA, C. M.; YADA, R. S. **Fasciolose animal no estado do Paraná – Análise de dados.** Arq. Biol. Tecnol, 1992 v.35, p. 777-780.

MACHADO, R.; FRANCINI, R.; BARBOSA, R. T.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. **Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes.** Circular Técnica. São Paulo, 2008.

MALAN, F. S.; VAN WYK, J. A.; WESSELS, C. D. **Clinical evaluation of anemia in sheep: early trials.** Onderstepoort J Vet Res. 2001 Sep;68(3):165-74.

MALAN, F. S.; VAN WYK, J. A. **The packed cell volume and color of the conjunctivae as aids for monitoring *Haemonchus contortus* infestations in sheep.** In: BIENNIAL NATIONAL VETERINARY CONGRESS, 1., 1992, Grahamstown, África do Sul. Anais... Grahamstown : South African Veterinary Association, 1992. V.1. p.139.

MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; YI, P.; ANDRADE, R.; CUBERO, F. J.; ALBANIS, E.; GOTUZZO, E.; ESPINOZA, J. R.; FRIEDMAN, S. L. **Mechanisms of Liver Fibrosis Associated with Experimental *Fasciola hepatica* Infection: Roles of Fas2 Proteinase and Hepatic Stellate Cell Activation.** J Parasitol. 2011 Feb;97(1):82-7.

MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M.; ROBLES-PÉREZ, D.; BENAVIDES, J.; MORÁN, L.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. **Effect of dietary supplementation with flaxseed oil or vitamin E on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*.** Res Vet Sci. 2014 Aug;97(1):71-9.

MATANOVIC, K.; SEVERIN, K.; MARTINKOVIC, F.; SIMPRAGA, M.; JANICKI, Z.; BARISIE, J. **Hematological and biochemical changes in organically farmed**

**sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*.** Parasitol Res. 2007 Nov;101(6):1657-61.

MATTOS, M. J. T.; UENO, H.; GONÇALVES, P. C.; ALMEIDA, J. E. M. **Seasonal occurrence and bioecology of *L. columella* Say, 1817 (Mollusca, Lymnaeidae) in its natural habitat in Rio Grande do Sul.** Revista Brasileira de Medicina Veterinária, 1997. v.19 n.6, p. 248-252.

MEKROUD, A.; CHAUVIN, A.; RONDELAUD, D. **Variations of biological indicators as highly presumptive markers for fasciolosis in experimentally-infected sheep.** Revue Méd. Vét., 2007, 158, 8-9, 437-441

MENESES, R. M. **Isolamento e caracterização molecular de *Anaplasma marginale* de origem congênita e avaliação da virulência em bezerros experimentalmente infectados.** 2013. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, 2013.

MURRAY, M.; RUSHTON, B. **Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep.** Journal of Comparative Pathology Volume 87, Issue 3, July 1977, Pages 459-470.

NETO FERREIRA, J.M., VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L.M. **Patologia Clínica veterinária.** 1 ed., Belo Horizonte: ed., Rabelo e Brasil Ltda, 1977.

OLAH, S.; WYK, J. A.; WALL, R.; MORGAN, E. R. **FAMACHA®: A potential tool for targeted selective treatment of chronic fasciolosis in sheep.** Vet Parasitol. 2015 Sep 15;212(3-4):188-92.

OLIVEIRA, E. L. **Prevalência e fatores associados à distribuição da *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 em bovinos dos Municípios de Careaçu e Itajubá, Região da Bacia do Rio Sapucaí-Minas Gerais.** 2008.100f. Dissertação (Mestrado

em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

PÊCEGO, O. Fiscalização sanitária de carnes e derivados. Estatística de verificação e apreensões e a sua importância. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, 1925, São Paulo, v. 2, n. 8 - 10, p. 375 - 389.

PILE, E.; SANTOS, J. A. A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELOS, M. ***Fasciola hepática* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil**. Brazil Journal Veterinary Research Animal Science., 2001, São Paulo, v. 1, p. 42 – 43.

PRESIDENTE, P. J. A.; MC CRAW, B. M.; LUMSDEN, J. H. **Experimentally induced *Fasciola hepática* infection in White-tailed Deer I. Clinicopathological and Parasitological Features**. Can J Comp Med. 1975 Apr; 39(2): 155–165.

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

RAADSMA, H. W.; KINGSFORD, N. M.; SUHARYANTA; SPITHILL, T. W.; PIEDRAFITA, D. **Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepática* in Merino sheep I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection**. Veterinary Parasitology, 2007, Volume 143, Issues 3–4, p. 275–286.

RIBEIRO, P. A. **Incidência das causas de rejeição de bovinos no Brasil Central, prejuízos causados pelas mesmas nos anos de 1946/47**. Rev. Fac. Med. Vet., 1949, S. Paulo — Vol. 4, fase. 1.

REZENDE, H. E. B. **Retrospectiva da Fasciolose bovina no Brasil. NA. 1º Sem. Nac. Parasitoses dos Bovinos.** (Eds. A. A. H. Beck, et al). Campo Grande, EMBRAPA, CNPGC. p. 133-143.

REY, L. ***Fasciola hepatica* no Gado do Rio Grande do Sul. Investigações sobre a possibilidade de ocorrência de casos humanos.** Revista Brasileira de Malariologia, 1957, v. 9, n. 4, p. 473 – 483.

ROJAS, C. A. A.; Ansell, B. R. E.; Hall, R. S.; Gasser, R. B.; Young, N. D.; Jex, A. R.; Scheerlinck, Jean-Pierre Y. **Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver.** Parasit Vectors. 2015 Feb 25;8:124.

ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; MEANA, A.; VALCÁRCEL, F.; VALLADARES, M. M. **Uptade on trematode infections in sheep.** Veterinary Parasitology, 2012, Volume 189, Issue 1, p. 15–38

ROSENBERG, G. **Exame clínico dos bovinos.** 3. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1993.

ROSS, J. G.; TODD, J. R.; DOW, C. **Single experimental infections of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).** Journal of Comparative Pathology 1966, Volume 76, Issue 1, p. 67-81.

RUSHTON, B.; MURRAY, M. **Hepatic pathology of primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep.** Journal of Comparative Pathology, 1977, Volume 87, Issue 3, p. 459-470

SANTOS, C. S.; SCHERER, P. O.; VASCONCELLOS, M. C.; PILE, E. M.; FREIRE, L. S.; SANTOS, J. A. A.; SERRA-FREIRE, N. M. **Registro de *Fasciola hepatica* em eqüinos (*Equus caballus*), caprinos (*Capra hircus*) e ovinos (*Ovis aries*) no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil.** R Bras. Ci. Vet., 2000, v. 7, n. 1, p. 63-64.

SERRA-FREIRE, N. M.; BORDIN, E. L.; LESSA, C. S. S.; SCHERER, P. O.; FARIAS, M. T.; MALACCO, M. A.; CORRÊA, T. C.; TSCHUMI, J. A. **Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil.** A Hora Veterinária, 1995, Edição Extra, n.1, p.19-21.

SERRA-FREIRE, N. M. **Fasciolose hepatica no Brasil: Análise Retrospectiva e Prospectiva.** Caderno Técnico Científico da Escola de Medicina Veterinária, ano 1, n. 1, p. 9 - 70, jul-dez, 1999.

SILVA, I. C.; MULLER, G.; MATTOS, M. J. T.; CASTRO A. L. D.; ALMEIDA, J. E. M. & UENO, H. **Fasciolose - Incidência e importância na bovino e ovinocultura no RS.** Lavoura Arrozeira, 1980, Porto Alegre, v. 33, n. 323, p. 34-42.

SILVA, O. M. C. Parasitoses animais. **Correio da Manhã**, Rio de Janeiro, p. 13, 12 jul. 1936.

SILVA, R. E.; LIMA, W. S.; CALDAS, W. S.; CURY, M. C.; MALACCO, A. F. **Primeiro encontro de *L. columella* (Say, 1817) naturalmente infectada por estádios intermediários de *F. hepatica* (Lynnaeus, 1758) na cidade de Itajubá, MG.** Revista de Patologia Tropical, 1994, Supl., v. 23, n. 2.

SCHWEIZER, G.; BRAUN, U.; DEPLAZES, P.; TORGERSON, P. R. **Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland.** Vet. Rec., 2005, 157, p. 188–193.

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

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

SINCLAIR, K. B. **The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the pathophysiology of challenge infections.** Research in Veterinary Science 1975, 19, p. 296-303.

SYKES, A. R.; COOP, R. L.; RUSHTON, B. **Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilization and blood constituents.** Res Vet Sci. 1980 Jan;28(1):63-70.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos.** 11 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 855p.

UENO, H.; GUTIERRES, V. C.; MATTOS, M. J. T.; MULLER, G. **Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil.** Veterinary Parasitology 1982, Volume 11, Issues 2–3, p. 185-191

UETA, M. T. **Infecção experimental de *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica*.** Ver. Saúde Públ. de São Paulo 1980, v. 11, n. 1, p. 43 – 57.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária,** 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 1996.

ZHANG, W. Y.; MOREAU E.; UOPE J. C.; HOWARD C.J.; HUANG W. Y.; CHAUVIN, A. ***Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep.** Experimental Parasitology 2005, Volume 111, Issue 3, p. 154–159.

## ANEXOS

### A1. Ficha de avaliação clínica

<b>AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS</b>	
Animal:	
Pelagem:	
Peso:	
Data:	
<b>PARÂMETROS AVALIADOS</b>	
Comportamento	( ) normal ( ) prostrado
Inspeção contorno abdominal	( ) normal ( ) ascite ( ) prenhes ( ) assimétrico
Edema submandibular	( ) ausente ( ) presente
Frequência cardíaca	_____/min
Frequência respiratória	_____/min
Mucosas Oculares	( ) 1- Vermelho robusto ( ) 3- Rosa ( ) 5- Branco ( ) 2- Vermelho rosado ( ) 4- Rosa pálido
Condição corporal	( ) 1- Caquético ( ) 3- Médio ( ) 5- Obeso ( ) 2- Magro ( ) 4- Gordo
Sensibilidade hepática	( ) ausente ( ) presente