

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Andréia Luiza Oliveira Costa

AÇÃO DO HIPOCLORITO SÓDIO SOBRE METACERCÁRIAS
DE *Fasciola hepatica*

Belo Horizonte

2020

Andréia Luiza Oliveira Costa

AÇÃO DO HIPOCLORITO SÓDIO SOBRE METACERCÁRIAS
DE *Fasciola hepatica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia

Orientadora: Professora Dr^a. Cintia
Aparecida de Jesus Pereira
Coorientador: Professor Dr. Walter dos
Santos Lima

Belo Horizonte

2020

043

Costa, Andréia Luiza Oliveira.

Ação do hipoclorito de sódio sobre metacercárias de *Fasciola hepatica*
[manuscrito] / Andréia Luiza Oliveira Costa. – 2020.

94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Aparecida de Jesus Pereira. Coorientador:
Prof. Dr. Walter dos Santos Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. *Fasciola hepatica*. 2. Metacercárias. 3. Zoonoses. 4. Hipoclorito de Sódio. I.
Pereira, Cintia Aparecida de Jesus. II. Lima, Walter dos Santos. III. Universidade
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andréia Luiza Oliveira Costa

410/2020/08
entrada
1º/2018
2018683297

Às **dez horas** do dia **17 de março** do ano de **2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Ação do hipoclorito de sódio sobre metacercárias de *Fasciola hepatica*”** área de concentração: **Helmintologia**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Cíntia Aparecida de Jesus Pereira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cíntia Aparecida de Jesus Pereira	UFMG	Aprovado
Dr. Marcos Pezzi Guimarães	UFMG	APROVAÇÃO
Dra. Mônica Alves Neves Diniz Ferreira	UFMG	Aprovado
Dr. Walter dos Santos Lima	UFMG	Aprovado

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): _____
O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 17 de março de 2020.

Dra. Cíntia Aparecida de Jesus Pereira _____
(Orientadora)

Dr. Marcos Pezzi Guimarães _____

Dra. Mônica Alves Neves Diniz Ferreira _____

Dr. Walter dos Santos Lima _____
(Coorientador)

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Daniella Castanheira Bartholomeu
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
SIAPE: 1517341

*Esse trabalho foi realizado no
Laboratório de Helminologia
Veterinária do Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biológicas (ICB) da Universidade
Federal de Minas Gerais.*

*Projeto aprovado conforme o comitê de
ética em experimentação animal da
UFMG, protocolo número 181/2015.*

Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa/CNPq, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Ao Programa de pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em nome da coordenadora Daniella Castanheira Bartholomeu, pela oportunidade e apoio na realização deste trabalho.

*Dedico esse trabalho a minha mãe,
Maria Luzia Oliveira Costa e minha
querida eterna avó, Vivência Cândida de
Oliveira, pelo investimento em meus
estudos e por sempre acreditarem nos
meus sonhos.*

“Nem sempre terás o que desejas, mas enquanto estiveres ajudando aos outros encontrarás os recursos de que precisas.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me proteger e me guiar, por iluminar meus caminhos e abençoar minha vida, por me dar sabedoria e determinação.

À minha professora Dr^a. Cíntia Aparecida de Jesus Pereira por ter me recebido de braços abertos e orientado durante a execução dos trabalhos. Agradeço pelos ensinamentos conquistados em uma orientação científica cautelosa e crítica, estimulando e dando o tempo para uma construção pessoal do trabalho. A disponibilidade, dedicação e paciência que sempre manifestou, me estimulando sempre a vencer as inseguranças deste processo. Professora Cíntia, você é um exemplo de mulher, que batalha todos os dias para conquistar seu espaço. Obrigada pela oportunidade. Tenho orgulho de ter sido sua aluna.

Ao professor Dr. Walter dos Santos Lima por ter me dado a oportunidade de trabalhar no LabHelVet, mesmo sabendo de todas as minhas limitações, pela disponibilidade, experiência, críticas e correções fantásticas e acima de tudo pelo incentivo na busca de resultados.

Aos meus pais Maria Luzia Oliveira Costa e Walter Magalhães Costa, pelos incentivos e persistência, sempre acreditando na minha capacidade.

A minha querida e eterna avó, Vivência Cândida de Oliveira gostaria que a senhora estivesse aqui para ver mais essa conquista. Gratidão eterna por você. Eu te amo.

A toda minha família, irmãos e amigos.

Aos amigos e amigas do LabHelVet pela companhia, disponibilidade e desabafos. Aos técnicos Hudson Andrade dos Santos e Luiza Moreira pelo aprendizado e risadas. As minhas companheiras de laboratório Lara Ribeiro de Almeida, Jéssica de Souza Joaquim, Ana Paula Ferreira por fazerem parte da minha vida, contribuindo para construção da minha vida acadêmica.

Aos alunos de iniciação científica.

Ao meu grupinho com muito amor, Ednéia, Valéria, Gustavo e Genil, não tenho palavras para agradecer o tanto que vocês foram importantes na minha vida.

A todos da turma de mestrado/2018, se não fosse vocês não conseguiria realizar esse sonho.

A todos que de alguma forma contribuíram para esta construção.

RESUMO

Fasciola hepatica parasita o parênquima hepático e as vias biliares de várias espécies de mamíferos, inclusive do homem, sendo considerada uma zoonose negligenciada com distribuição cosmopolita. Os hospedeiros definitivos e acidentalmente os humanos, infectam-se ingerindo metacercárias que estão aderidas as folhas de vegetais cultivados dentro e/ou nas proximidades do curso d'água ou pelo consumo de água contaminada com essas formas infectantes. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda o uso de hipoclorito de sódio (NaClO) para desinfecção de hortifrutigranjeiros, para o controle de patógenos, no entanto, não existe referência científica da ação de NaClO sobre metacercárias de *F. hepatica*. Nesse trabalho avaliou-se a eficácia de NaClO, sobre metacercárias de *F. hepatica*. Utilizou-se quatro grupos de camundongos C57BL/6J, (n = 9, para cada grupo), infectados com metacercárias expostas ao NaClO. Grupo I: NaClO na concentração de 0,2 %; Grupo II: NaClO na concentração de 0,02%, Grupo III: NaClO na concentração de 0,002% e Grupo IV: controle infectado com metacercária livre de NaClO. Incubou-se metacercárias (n= 500) recuperadas de *Galba cubensis*, em 1000 µL/concentração de NaClO/15min/25°C. Em seguida, inoculou-se individualmente por via oral metacercárias (n=10) nos camundongos, para análise da infectividade. Os camundongos foram avaliados por 90 dias. Durante o período experimental esses animais foram mantidos em condições de bem estar e alimentados com ração e água *ad libitum*. Avaliou-se a curva de sobrevivência e os sinais clínicos. Nos animais que foram a óbito, foi realizada a avaliação macroscópica das lesões hepáticas, análise histopatológica do fígado e recuperação de parasitos. Os animais que sobreviveram aos 90 dias após-infecção (dpi) foram submetidos a três contagens de ovos por gramas de fezes (OPG). Realizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) em 10 metacercárias/grupo fixadas em paraformaldeído 4%/48h/4°C. Os dados foram analisados mediante os testes: variância (*Tukey*). Ao 20° dpi observou-se nos animais: prostração e pelo arrepiado. A partir da 4ª semana após-infecção (spi) morreram no grupo I, 78% dos camundongos, no grupo II, 89% dos camundongos, nos grupos III e grupo IV, 87% dos camundongos. Observou-se macroscopicamente lesões necrótico-hemorrágicas, ictericas difusas a disseminadas nos fígados dos animais. Na histopatologia foram observadas áreas de destruição de hepatócitos, infiltrado inflamatório difuso, hemorragia e necrose por coagulação. Recuperou-se parasitos com 4 mm comprimento x 3 mm de largura na 4° spi. Ao 90° dpi, os animais sobreviventes estavam negativos no OPG. Pela MEV observou-se integridade da parede externa das metacercárias. Conclui-se que

metacercárias de *F. hepatica* tratadas com NaClO, permitem o desenvolvimento da fasciolose.

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*, metacercária, zoonose, hipoclorito de sódio.

ABSTRACT

Fasciola hepatica parasites the hepatic parenchyma and bile ducts of various species of mammals, including the human being and is considered a neglected zoonosis with cosmopolitan distribution. Infection of definitive hosts and human beings, accidental hosts, occurs through the ingestion of metacercariae that are adhered to the leaves of vegetables cultivated inside or in the vicinity of a watercourse or by the ingestion of contaminated water. The Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recommends that use of sodium hypochlorite (NaClO) for the disinfection of horticultural products and for the control of pathogens; however, there is no scientific reference to the action of NaClO on *F. hepatica* metacercariae. In this study we evaluated the efficacy of NaClO on *F. hepatica* metacercariae. Four groups of C57BL/6J mice (n = 9, for each group) were infected with metacercariae treated with NaClO. Group I: 0.2% NaClO; Group II: 0.02% NaClO; Group III: 0.002% NaClO and; Group IV: control group of mice infected with non-treated metacercariae. Metacercariae (n = 500), retrieved from *Galba cubensis*, were incubated in 1000 µL/ NaClO concentration for 15 min at 25 °C. In the next step, 10 metacercariae were inoculated in each mouse for infectivity analysis. Infected mice were evaluated for 90 days post infection (dpi). During the experimental period animals were maintained in welfare conditions and feed with ration and water ad libitum. The survival curve and clinical signs were also evaluated. In animals that have died, macroscopic assessment of liver lesions, liver histopathological analysis and parasites recovery were performed. Mice that have survived for 90 days were submitted to three parasitological stool examination (egg count per gram of feces – EPG). 10 metacercariae for each studied group were fixed with 4% paraformaldehyde for 48 hours at 4°C and analyzed through scanning electron microscopy (SEM). The collected data were analyzed using variance tests (Tukey). Jaundice, lethargy, prostration and bristly hair were observed in experimental animals on the 20 th dpi. From the 4 th week of infection, 78% of studied mice died in group I, 89% in group II and 87% in groups III and IV. Necrotic-hemorrhagic lesions and diffuse to disseminated jaundice were observed in animals' livers. Histopathological examination showed areas of hepatocyte destruction, diffuse inflammatory infiltrates, hemorrhage and necrosis by coagulation. Parasites 4 mm long x 3 mm wide were also recovered from infected animals in the 4 th week post infection. In the 90 th dpi animals that have survived were EPG negative. SEM showered integrity of metacercariae's external membrane. In conclusion, *F. hepatica* metacercariae treated with NaClO were able to develop and to establish infection in mice.

Key words: *Fasciola hepatica*, metacercariae, zoonosis, sodium hypochlorite

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ciclo de <i>Fasciola hepatica</i>	27
FIGURA 2 - Foto da microscopia óptica (2A); Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura, (MEV-Quanta 3D FEG) (2B), metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> . Metacercárias de <i>F. hepatica</i> após tratamento com NaClO nas concentrações de 0,2% (Grupo I), 0,02% (Grupo II), 0,002% (Grupo III) e metacercárias + H ₂ O (Grupo IV).....	47
FIGURA 3 - Camundongo C57BL/6J experimentalmente infectado por <i>Fasciola hepatica</i> . A e B: animal prostrado, com pelagem arrepiada.....	49
FIGURA 4 - Grupo Controle (sem infecção) - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J em microscópio estereoscópio, aumento de 25x. A: Fígado de camundongo C57BL/6J com lobo esquerdo preservado. B: Fígado de camundongo C57BL/6J com lobo medial preservado e vesícula preservada. C: Fígado de camundongo C57BL/6J com lobo caudal preservado.....	54
FIGURA 5 - Grupo I - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados por <i>Fasciola hepatica</i> , em microscópio estereoscópio aumento de 25x. A: Fígado, lobo esquerdo; lesão hemorrágica e ictérica (seta preta). B: Fígado, lobo medial; vesícula com tamanho aumentado (seta preta). C: Fígado, lobo caudal; área de lesão extensa esbranquiçada (seta preta). D: Fígado com áreas de necrose em lobo esquerdo (seta preta).....	54
FIGURA 6 - Grupo II - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados por <i>Fasciola hepatica</i> , em microscópio estereoscópio aumento de 25x. A: Fígado, lobo caudado; lesão extensa, áreas hemorrágicas e ictéricas (seta preta). B: Fígado, lobo medial; áreas de lesão extensa, hemorrágicas, ictéricas e escurecimento do líquido da vesícula biliar (seta preta). C: Fígado, lobo caudal; orifício devido à migração do parasito (seta preta). D: Fígado, lobo esquerdo; áreas extensas de hemorragia (seta preta).....	55
FIGURA 7 - Grupo III - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados por <i>Fasciola hepatica</i> , em microscópio estereoscópio aumento de 25x. A: Fígado, lobo medial; lesão extensa esbranquiçada (seta preta). B: Fígado, lobo esquerdo; áreas de necrose (seta preta). C: Fígado, lobo caudal; área de lesão extensa esbranquiçada (seta preta). D: Fígado, lobo medial; vesícula aumenta com líquido escurecido (seta preta).....	56

FIGURA 8 - Grupo IV - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados por <i>Fasciola hepatica</i> , em microscópio estereoscópio aumento de 25x. A: Fígado, lobo esquerdo; lesão extensa esbranquiçada e áreas hemorrágicas (seta preta). B: Fígado, lobo caudal; lesão focal esbranquiçada e orifício devido à migração do parasito (seta preta). C: Fígado, lobo medial; lesão hemorrágica (seta preta). D: Fígado, lobo esquerdo; lesão focal esbranquiçada (seta preta).....	57
FIGURA 9 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com H2O (Grupo IV). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE), aumento 4x. Observa-se pequenas áreas de hepatócitos preservados (P). Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose em diferentes estágios.....	58
FIGURA 10 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com H2O (Grupo IV). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE), aumento 20x. Observa-se áreas de necrose em diferentes estágios, com predomínio de cariólise (*), hepatócitos com núcleos picnóticos (**) e infiltrado inflamatório (seta branca).....	59
FIGURA 11 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com H2O (Grupo IV). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE), aumento 20x. Área de necrose (*); infiltrado inflamatório (seta amarela) no espaço porta (EP); seta verde ducto biliar.....	60
FIGURA 12 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com H2O (Grupo IV). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE); aumento 60x. Área de desaparecimento de hepatócitos (*), presença de neutrófilos (seta azul); área de necrose (*); hepatócitos preservados (P).....	61
FIGURA 13- Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com NaClO 0,002% (Grupo III). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). A: Aumento 4x B: Aumento de 20x.....	62
FIGURA 14 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com NaClO 0,002% (Grupo III). C: Aumento de 40x. D: Aumento de 60x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos; Estrela (★) áreas de desaparecimento de hepatócitos e presença de infiltrado inflamatório; (P) áreas de hepatócitos preservados.....	63
FIGURA 15 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com NaClO 0,02% (Grupo II). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). A: Aumento 4x. B: Aumento de 20x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de	

hepatócitos; Estrela (★) áreas de desaparecimento de hepatócitos e presença de infiltrado inflamatório; (EP) espaço porta.....	64
FIGURA 16 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com NaClO 0,02% (Grupo II). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 40x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos.....	65
FIGURA 17 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com NaClO 0,2% (Grupo I). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). A: Aumento 4x. B: Aumento de 20x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos; Estrela (★) áreas de desaparecimento de hepatócitos e presença de infiltrado inflamatório; (P) hepatócitos preservados.....	66
FIGURA 18 - Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratada com NaClO 0,2% (Grupo I). C: Aumento de 40x. D: Aumento de 60x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos; Estrela (★) áreas de desaparecimento de hepatócitos e presença de infiltrado inflamatório; (P) hepatócitos preservados.....	67
FIGURA 19 - <i>Fasciola hepatica</i> – Parasito jovem (4 mm de comprimento x 3 mm de largura), recuperado ao 22° dpi do fígado de um camundongo C57BL/6J do grupo II, experimentalmente infectado por <i>Fasciola hepatica</i> , em microscópio estereoscópio aumento de 25x. Sistema digestório; a. Ventosa oral. b. Ventosa ventral ou acetábulo. c. cecos intestinais.....	69

LISTA DE GRÁFICO E TABELAS

GRÁFICO 1 - Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com 10 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> tratadas com hipoclorito de sódio. Grupo I (NaClO na concentração de 0,2%); Grupo II (NaClO na concentração de 0,02%); Grupo III (NaClO na concentração de 0,002%); Grupo IV (sem tratamento prévio com NaClO).....	48
TABELA 1 - Análise clínica dos camundongos C57BL/6 infectados por <i>Fasciola hepatica</i>	50
TABELA 2 - Média de peso dos camundongos C57BL/6 infectados por <i>Fasciola hepatica</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
dpi	dia (s) após-infecção
spi	semana (s) após-infecção
HE	Hematoxilina-Eosina
mL	mililitros
cm	centímetros
mm	milímetros
µm	micrômetros
µL	microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Biologia do parasito <i>Fasciola hepatica</i>	22
2.2 Ciclo biológico e hospedeiros de <i>Fasciola hepatica</i>	25
2.3 Ocorrência e distribuição de <i>Fasciola hepatica</i>	28
2.4 Casos de fasciolose humana no Brasil.....	31
2.5 Patologia da fasciolose.....	34
2.6 Sinais clínicos e sintomas da fasciolose.....	36
2.7 Controle da fasciolose.....	37
2.8 Hipoclorito de sódio (NaClO), propriedades químicas e uso nas desinfecções de produtos alimentícios.....	37
3 JUSTIFICATIVA	40
4 OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo Geral.....	41
4.2 Objetivos Específicos.....	41
5 MATERIAIS E METODOLOGIA	42
5.1 Manutenção de limnédeos em laboratório.....	42
5.2 Obtenção de ovos e miracídios de <i>Fasciola hepatica</i>	42
5.3 Infecção experimental de <i>Galba cubensis</i> por <i>Fasciola hepatica</i> e obtenção das metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i>	43
5.4 Teste com hipoclorito de sódio (NaClO).....	43
5.5 Análise morfológica das metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> após teste com hipoclorito de sódio por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
5.6 Análise da infectividade das metacercárias tratadas, por meio da infecção experimental de camundongos C57BL/6J.....	44
5.7 Necropsia e eutanásia dos animais infectados experimentalmente.....	45
5.8 Histopatologia hepática.....	45
5.9 Fixação dos parasitos jovens recuperados na necropsia dos camundongos infectados por <i>Fasciola hepatica</i>	46
5.9.1 Análises estatísticas.....	46
5.9.2 Delineamento experimental.....	46
6 RESULTADOS	47
6.1 Análise morfológica das metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i>	47

6.2 Análise clínica dos camundongos C57BL/6 infectados por <i>Fasciola</i>	49
6.3 Peso dos camundongos infectados por <i>Fasciola hepatica</i>	51
6.4 Alterações macroscópicas do fígado de camundongos infectados por <i>Fasciola hepatica</i>	53
6.5 Histopatologia hepática.....	58
6.6 Parasitos recuperados do fígado de camundongos infectados por <i>Fasciola hepatica</i>	68
7 DISCUSSÃO	70
8 CONCLUSÕES	74
9 REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) é um helminto da classe Trematoda, subclasse Digenea, família Fasciolidae, um dos agentes etiológicos da fasciolose (CORDOVA et al., 1997; DORNY et al., 2009; KNUBBEN-SCHWEIZER; TORGERSON, 2015). É um parasito de fígado e ductos biliares de diversos mamíferos domésticos e silvestres, principalmente de bovinos, ovinos, caprinos, equinos e acidentalmente do homem, ocasionando grave prejuízo econômico à pecuária mundial (STOLL, 1947; ECHEVARRIA, 1995, 2004; CRUZ, 2013; GUIMARÃES, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014), *F. hepatica* está listada dentre as “*Foodborne trematode infections*”, sendo assim esse é um parasito pertencente ao grupo dos trematódeos causadores das doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Na medicina veterinária observam-se danos devido à condenação de fígados em frigoríficos e abatedouros, perda de peso dos animais, infecções secundárias, redução da produção de leite, carne, lã, redução da fertilidade, abortos, despesa com medidas de controle, custos com o tratamento e em alguns casos pode resultar na morte dos animais (SPITHILL et al., 1997; FAIRWEATHER et al., 1999; FARIA et al., 2005; FAIRWEATHER, 2011). No Brasil a maior área enzoótica da fasciolose bovina está localizada na região Sul do país, com focos menores nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Atualmente *F. hepatica* é encontrada em animais dos seguintes estados: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Mato Grosso e Pará. A mesorregião Sul/Sudoeste é a principal área de importância epidemiológica. Os casos da doença geralmente estão associados às áreas rurais, que na maioria das vezes apresentam condições eco epidemiológicas favoráveis à ocorrência de fasciolose (SERRA-FREIRE, 1990, 1995; LIMA et al., 2009; BENNEMA et al., 2014). Em Minas Gerais (MG) vêm sendo reportada a incidência de fasciolose animal, principalmente em bovinos, com dados de propriedades, frigoríficos, serviços de inspeção e por meio de exames coproparasitológicos (LIMA et al., 2009; DRACZ; LIMA, 2014; DRACZ et al., 2016).

Conquanto, essa parasitose também é uma doença negligenciada, com importância epidemiológica nas Américas. A fasciolose humana foi considerada uma zoonose de importância secundária até 1990. Todavia, a importância da doença humana ao nível de saúde pública começou a mostrar-se a partir dos anos 2000, com a descrição progressiva de casos humanos, com o aumento dos relatórios de casos clínicos da

doença, sendo que muitas vezes os achados são acidentais (WHO, 1995, 2007, 2013, 2014).

Fasciola hepatica tem distribuição por todos os continentes, sendo nos últimos 25 anos reportados casos distribuídos na África (487 casos), América (3267), Ásia (354), Europa (2951) e Oceania (12) (ESTEBAN et al., 1997; MAS-COMA; BARGUES, 1996; MÜLLER, 1998, 1999; ASHRAFI et al., 2006a; MAS-COMA et al., 2018). Em 51 países de todos os continentes, foram reportados cerca de 7.071 casos, com o maior número de casos de fasciolose humana no continente americano. Na América estão registrados aproximadamente 3.286 casos humanos, na maioria das vezes os achados são acidentais, distribuídos nos Estados Unidos (1), México (33), Cuba (782), Costa Rica (13), Porto Rico (18), Venezuela (11), Peru (1.210), Bolívia (1.021), Chile (45), Argentina (13), Uruguai (95) e Brasil (82) (PILE et al., 2000, ASHRAFI et al., 2006b; AQUINO et al., 2018).

Os casos de fasciolose humana no país já foram descritos nos Estados do Paraná (25), São Paulo (21), Rio de Janeiro (3), Mato Grosso do Sul (6), Bahia (2), Rio Grande do Sul (2), Santa Catarina (1) e Amazonas (22) (REY, 1957, 1958; SANTOS; VIEIRA, 1965, 1967; MATTAR; AMARAL, 1967; SANTOS, 1967; CORREA; FLEURY, 1971; BARANSKI et al., 1977; AMARAL; BUSETTIET, 1979; PILE et al., 2000; SERRA-FREIRE; NUERNBERG, 1992; SERRA-FREIRE et al., 1995; SERRA-FREIRE, 1999, 2011; MACIEL et al., 2018).

A forma de transmissão desse parasito ocorre por meio da ingestão de metacercárias, um cisto formado por quatro camadas de mucopolissacarídeos. A infecção humana está diretamente relacionada com a ingestão de produtos hortifrutigranjeiros e/ou água contaminada com essas formas infectantes (BORAY; ENIGK, 1964; BORAY, 1969; BJORLAND et al., 1995; ESTEBAN et al., 1997).

As metacercárias são elo fundamental na transmissão e epidemiologia da fasciolose. É comum o relato de humanos que se infectaram ao consumir vegetais crus cultivados dentro e/ou nas proximidades do curso de água, como o agrião (*Nasturtium officinale*) e/ou água contaminada com as metacercárias (MACIEL et al., 2018).

Para o controle da transmissão do parasito devem-se identificar produtos anti-metacercárias de *F. hepatica* capazes de interromper o ciclo biológico do parasito. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda a utilização de hipoclorito de sódio para desinfecção de hortifrutigranjeiros antes do consumo, para o controle de patógenos, sendo assim, pesquisas que busquem evidenciar a ação de

produtos desinfetantes sobre metacercárias de *F. hepatica* devem ser realizados, uma vez que, estes estudos poderão ser utilizados como fator de prevenção e controle da infecção humana (BRASIL, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia do parasito *Fasciola hepatica*

Fasciola hepatica é um helminto pertencente ao reino Animalia, filo Platyhelminthes, classe Trematoda (Rudolphi, 1808), subclasse Digenea (Van Beneden, 1858), família Fasciolidae (Railliet, 1895), subfamília Fasciolinae (Hassal, 1898), gênero *Fasciola* (Linnaeus, 1758), espécie *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (CORDOVA et al., 1997; DORNY et al., 2009; QUEIROZ et al., 2002; KNUBBEN-SCHWEIZER; TORGERSON, 2015).

O parasito possui oito fases evolutivas divididas entre os hospedeiros definitivos e intermediários, sendo: ovo, miracídio, esporocisto, rédia, cercária, metacercárias, parasito jovem e adulto. O parasito adulto possui aspecto foliáceo, achatado dorsoventralmente, não possui exo ou endoesqueleto, mede cerca de 3,0 cm de comprimento por 1,5 cm de largura e possui cor pardo-acinzentada. Apresenta uma ventosa oral, localizada na extremidade anterior, a partir da qual segue uma curta faringe, dessa, partem dois ramos cecais extremamente ramificados, um de cada lado, até a extremidade posterior. Abaixo da ventosa oral está localizada a ventosa ventral e junto a esta, observa-se a abertura do poro genital. *F. hepatica* é hermafrodita, possuindo aparelho genital feminino, composto por um ovário ramificado, oótipo, útero e glândulas vitelinas extremamente ramificadas ocupando as partes laterais e posterior do parasito e aparelho genital masculino, composto de dois testículos muito ramificados, canal eferente, canal deferente e bolsa do cirro, correspondente ao órgão copulador. A abertura do poro genital é comum ao sistema genital masculino e feminino. O tegumento é coberto por espinhos disseminados na porção anterior, que auxiliam na fixação do helminto nos ductos biliares (GUIMARÃES, 2016; RIBEIRO et al., 2017). O sistema nervoso central compreende um par de gânglios, um à esquerda e outro à direita da faringe, logo abaixo da ventosa oral. Estes gânglios são conectados por junções transversais que percorrem toda a superfície dorsal da faringe. Dos gânglios partem três cordões nervosos, um ventral, um lateral e um dorsal. O sistema nervoso

periférico compreende fibras e corpos celulares abaixo do tegumento. O sistema digestório possui faringe, esôfago e ceco, que termina em fundo cego. O sistema excretor é constituído por células-flama conectadas por túbulos que lançam seus produtos de excreção para fora do corpo por meio de um poro situado na porção terminal do parasito (FAIRWEATHER et al., 1999; GUIMARÃES, 2016; RIBEIRO et al., 2017).

Os ovos do parasito são constituídos por um óvulo fertilizado, contendo células vitelínicas, rodeado por um invólucro protéico (HUSSEIN et al., 2010). Medem cerca de 150 µm de comprimento e 100 µm de largura, possuem forma elíptica, cor amarelada e em uma de suas extremidades apresenta uma abertura que é fechada pelo opérculo, por onde saem os miracídios (BARUCH, 1999). Os ovos são muito resistentes, sobrevivendo por muitos meses no solo (REY, 2008). Os miracídios, primeiro estágio do parasito, medem aproximadamente o mesmo comprimento dos ovos, tendo placas ciliadas e são mais largos na porção anterior e afilados na posterior. Vivem por um curto período na água, entre a eclosão do miracídio e a penetração no molusco. Os esporocistos possuem forma de saco alongado, apresentando em seu interior aglomerados de células germinativas em multiplicação. As rédias possuem forma cilíndrica e medem de 1–3 mm de comprimento. Apresentam um esboço do aparelho digestório. Na região anterior do corpo, possui uma abertura por onde sairão as cercárias que são formadas a partir de células germinativas em contínua multiplicação no interior das rédias (REY, 2008; GUIMARÃES, 2016; OLIVEIRA, 2008).

As cercárias têm aspecto de disco, medem de 250-350 µm de comprimento com uma cauda longa e não bifurcada. Assim como a forma adulta de *F. hepatica*, possui ventosas oral e ventral, faringe, esôfago e intestino. Lateralmente existem glândulas cistogênicas, envolvidas no processo de encistamento. A metacercária é a forma evolutiva da cercária, encistada, e tem tonalidade amarelada (ANDREWS, 1999; REY, 2008; OLIVEIRA, 2008). Com a perda da cauda, formando uma membrana de proteção em torno de si. As metacercárias são constituídas por duas paredes, a parede externa do cisto formada por duas camadas, a camada I e II e a parede interna do cisto formada por outras duas camadas, a camada III e IV. A parede externa das metacercárias de *F. hepatica* é formada imediatamente após a fixação das cercárias ao substrato por meio das ventosas ventral e dorsal, com auxílio do material secretado pelas glândulas cistogênicas que secretam grânulos de proteínas por todo o tegumento da metacercária e aos poucos se transformam em filamentos dando origem a 1º camada das metacercárias.

Morfologicamente a camada I possui aspecto esponjoso com uma rede espessa de filamentos que estão presos à fina camada mais homogênea, a camada II. A parede interna do cisto é formada logo após a última camada da parede externa, entretanto, após a formação da parede externa há um espaço vazio. Os precursores que darão origem a parede interna e conseqüentemente as camadas III e IV são também secretados por todo o tegumento. Todas as camadas são formadas por produtos secretados das glândulas cistogênicas. A camada III estende-se enormemente e seus sulcos profundos aparecem em toda a superfície abrindo-se em uma área que irá futuramente corresponder à ventosa ventral. A superfície recém-formada da camada III é provida de numerosos poros de 1-3 μm de diâmetro e de fissuras estreitas levemente amassadas. A camada IV é formada de queratina (DIXON, 1964a; DIXON 1965; DIXON; MERCER, 1967).

Dixon e Mercer (1964 a e b) sugerem que as metacercárias quando formadas totalmente tem uma superfície irregular com sulcos transversais e com observação mais detalhada da superfície por meio da microscopia eletrônica de varredura é possível observar uma superfície rugosa. Além disso, os autores observaram que a camada I pode atuar como uma barreira contra-ataques bacterianos, fúngicos e servir de proteção contra dessecação, permitindo assim um sucesso evolutivo do parasito no meio ambiente. De acordo com Dixon e Mercer (1967) as várias camadas concêntricas da parede do cisto, ou seja, das metacercárias de *F. hepatica*, são formadas de polissacarídeos provenientes das glândulas cistogênicas da cercária durante o desenvolvimento. Os precursores granulares são formados em grupos separados de células que migram para o epitélio superficial (epitélio embrionário) durante o desenvolvimento. Os grânulos são liberados para formar a parede externa pelo rompimento do epitélio embrionário no início do encistamento. Esse processo é rápido e concluído em poucos minutos. As células possuem formato de folhas laminadas e migram de dentro das cercárias por meio de lacunas na superfície da musculatura, formando um novo epitélio que substitui o anterior. Depois desse processo as células na região interna das cercárias começam uma série de movimentos oscilatórios complexos. Os movimentos permitem a fusão da membrana vacuolar com a membrana plasmática sem destruírem a integridade das células, formando assim um novo epitélio, que dará origem após o densencistamento ao parasito jovem (DIXON, 1965).

2.2 Ciclo biológico e hospedeiros de *Fasciola hepatica*

Fasciola hepatica é cosmopolita, com ciclo do tipo heteroxênico. Desse modo, esse parasito pode ser transportado por inúmeras espécies de animais para as mais diferentes regiões do planeta, provavelmente foi dessa forma que alcançou uma distribuição geográfica ampla, podendo ser encontrado em áreas de todos os continentes, exceto a Antártida (GOMES, 2003).

As infecções por *F. hepatica* ocorrem após a ingestão de produtos hortifrutigranjeiros (legumes, verduras e folhas), e/ou água e pastagem contaminadas com metacercárias. Após serem ingeridas pelos hospedeiros definitivos, tais como, mamíferos domésticos, silvestres e acidentalmente os homens, as metacercárias desencistam-se devido à ação do suco gástrico e os parasitos jovens atravessam a parede do intestino delgado alcançando a cavidade peritoneal e migrando até o fígado. Após atravessarem a cápsula hepática, os parasitos imaturos migram pelo parênquima hepático, onde se alimentam de tecidos, restos celulares e sangue. Entre 35 a 45 dias os parasitos permanecem migrando pelo parênquima hepático. Após esse período, alcançam os ductos biliares onde atingem a maturidade sexual (SILVA et al., 1994; ANDREWS, 1999; GUIMARÃES, 2016; DRACZ et al., 2016; MAS-COMA et al., 2018).

Nos ductos biliares, mais ou menos 50 a 60 dias após-infecção (dpi) iniciam a postura dos ovos. Os ovos são operculados não embrionados, que com a bile, são lançados para o duodeno, percorrem o trato intestinal e são eliminados junto com as fezes dos hospedeiros (SILVA et al., 1994; ANDREWS, 1999; GUIMARÃES, 2016; DRACZ et al., 2016). Os ovos quando presentes no ambiente em contato com corpos hídricos apresentam uma massa celular que em condições favoráveis de temperatura, umidade e oxigenação, desenvolve-se de oito a 14 dias, dando origem a uma larva ciliada denominada miracídio, que secretam enzimas proteolíticas, produzidas pela glândula apical, que digere o opérculo e eclode ativamente. Após a eclosão os miracídios locomovem-se ativamente com o auxílio das placas ciliadas em busca de moluscos da família Lymnaeidae (Gastropoda, Basommatophora) que atuam como hospedeiro intermediário. Os hospedeiros intermediários de *F. hepatica* da família Lymnaeidae (Rafinesque, 1815), geralmente são encontradas em ambientes como remansos de rios, lagoas, áreas pantanosas, próximos às margens da água sobre macrófitas aquáticas e semiaquáticas, lama e matéria orgânica de origem vegetal em

decomposição (RIBEIRO, 2016; RIBEIRO et al., 2017). As espécies de limneídeos registrados no Brasil são: *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817), *Galba viatrix* (d'Orbigny, 1835), *Galba truncatula* (Müller, 1774) e *Galba cubensis* (Pfeiffer, 1839), sendo que *P. columella* já foi registrada em aproximadamente 400 municípios brasileiros (BENNEMA et al., 2014).

Pseudosuccinea columella foi reportado naturalmente infectado nos seguintes estados brasileiros: Rio de Janeiro (REZENDE et al., 1973; PILE et al., 2000; GOMES et al., 2002), São Paulo (UETA, 1980; AMATO; SILVA, 1987; OLIVEIRA et al., 2007), Minas Gerais (SILVA et al., 1994; COELHO; LIMA, 2003; LIMA et al., 2009; DRACZ; LIMA, 2014), Rio Grande do Sul (GONZALES et al., 1974; MATTOS; UENO, 1982; SILVA et al., 1994), Paraná (QUEIROZ et al., 2002). A espécie *G. viatrix* foi encontrada naturalmente infectada no estado do Rio Grande do Sul. Em relação às espécies *G. truncatula* e *G. cubensis*, até o momento, não foram encontradas naturalmente infectadas no país. Alguns autores sugeriram que a variação geográfica influencia a susceptibilidade à infecção por *F. hepatica* ou desenvolvimento deste parasito intramolusco (UETA, 1980; DACAL et al., 1988; COELHO et al., 2009).

A infecção dos limneídeos ocorre a partir do contato dos miracídios nos tecidos da região cefalopodal por meio do *terebratorium*. Em seguida este elimina o conteúdo enzimático das “glândulas de penetração”, para alcançar os tecidos do molusco. Cada miracídio, que consegue driblar o sistema interno de defesa do limneídeo, forma um esporocisto, que é formado por um aglomerado de células germinativas de intensa atividade mitótica, que dá origem a várias rédias, que são caracterizadas pela presença de ventosa oral, faringe e intestino rudimentar, bem como ausência de gônadas. As rédias iniciam a ingestão dos tecidos do hospedeiro intermediário, preferencialmente da glândula digestiva e do aparelho reprodutor. À medida que desenvolvem, apresentam mórulas embrionárias na cavidade do corpo que podem dar origem a rédias de segunda geração (dependendo das condições adversas do ambiente) e/ou cercárias. Também apresentam duas projeções laterais e poro de nascimento características de rédias maduras. As cercárias apresentam cauda não bifurcada e saem ativamente pelo poro de nascimento. Quando eliminadas nas coleções aquáticas movimentam-se ativamente, aderem a um substrato e/ou lâmina d'água, perdem a cauda e liberam o conteúdo das glândulas cistogênicas, formando as metacercárias, que são as formas infectantes para o hospedeiro definitivo. Desde a penetração do miracídio no molusco até a liberação de cercária decorrem 30 a 60 dias. Cada miracídio é capaz de produzir cerca de 225

cercárias. Em um estudo realizado por Ferreira (2019) ao infectar 200 moluscos da espécie *Galba cubensis*, observou-se a recuperação de 226 metacercárias em 2,5 % dos moluscos infectados a partir de 49 dpi (**Figura 1**) (DAWES, 1962; KENDALL, 1950; BORAY, 1967; ANDREWS, 1999).

A vida útil de um parasito adulto em humanos pode chegar a 13,5 anos, até dois anos em bovinos ou até 20 anos em ovinos. Os parasitos jovens que migram pelo parênquima hepático na fase aguda possuem as mesmas características do parasito na fase adulta, entretanto não apresentam sistema reprodutor desenvolvido e tem tamanhos menores (MOAZENI e AHMADI, 2016; ANDREWS, 1999; MAS-COMA et al., 2018).

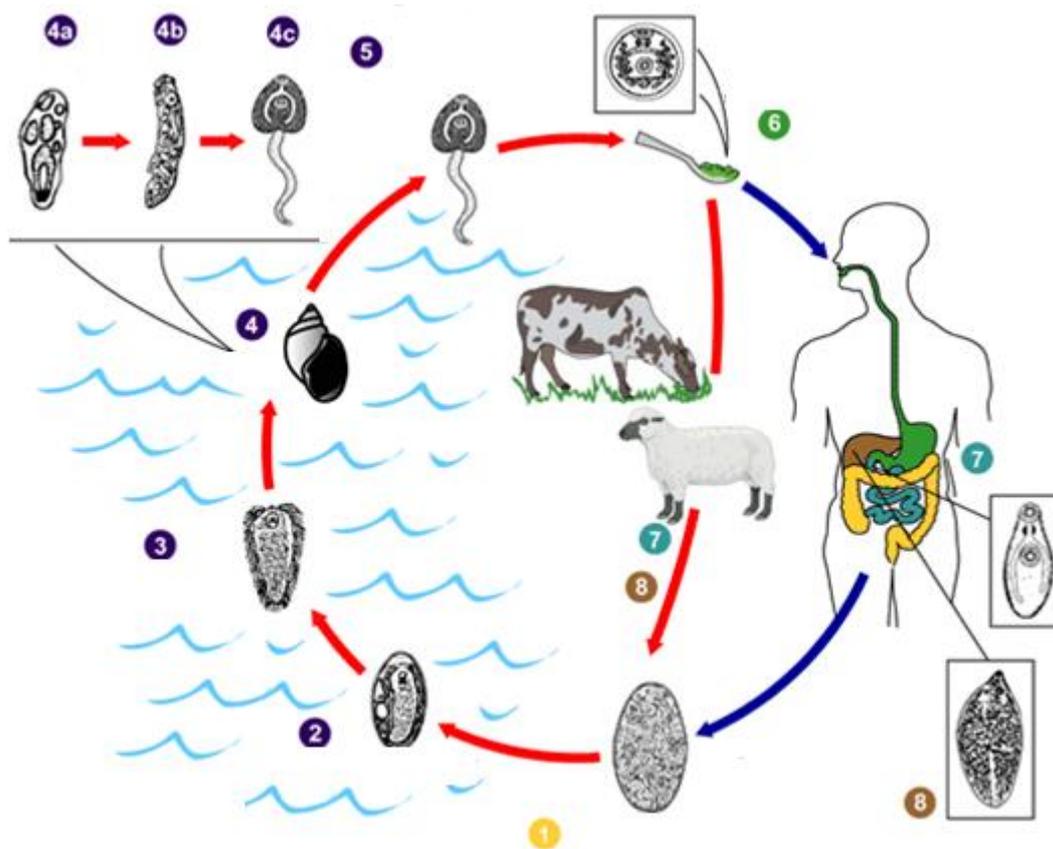


Figura 1: Ciclo de *Fasciola hepatica*. 1. Ovos não embrionados são liberados nos ductos biliares e excretados nas fezes. 2. Os ovos são embrionados na água. 3. Os ovos liberam miracidios, que invadem um molusco (hospedeiro intermediário). 4. No molusco, os parasitos passam por vários estágios de desenvolvimento (a. esporocistos, b. rédias e c. cercárias). 5. As cercárias são liberadas do molusco e se encistam como metacercárias na vegetação aquática ou em outras superfícies. 6. A fasciolose é adquirida pela ingestão de plantas, especialmente agrião e/ou água contendo metacercárias. 7. Após a ingestão, as metacercárias desencistam-se com ação do suco gástrico. 8. Migram da parede intestinal pela cavidade peritoneal até o parênquima hepático e para os ductos biliares, onde se transformam em adultos. Fonte: Figura modificada do CDC, pelo autor. Disponível em: https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/v1014602_pt

2.3 Ocorrência e distribuição de *Fasciola hepatica*

A trajetória do parasito *F. hepatica* no mundo é tão antiga quanto à história da humanidade. Achados paleontológicos na Alemanha, datados de 3.000 a.C., revelam a presença de ovos desse trematódeo em restos humanos e de bovinos, mostrando que já era encontrado no velho mundo (BRAVO, 2007). Na história, o primeiro registro de *F. hepatica* teria se dado no século IX no Tratado de Saúde Animal do Mundo Árabe, quando é citada “uma doença de fígado” em ovinos, sendo o primeiro trematódeo a ter seu ciclo de vida descrito em 1882 na Alemanha (MENDES, 2006).

A primeira referência à infecção por *Fasciola* spp. foi feita em ovelhas em 1379 por Jean de Brie, francês nomeado pelo Rei Charles V para escrever um tratado sobre o manejo de ovinos para aprimorar a produção de lã, que relatou que a existência de “erva daninha de folhas que vivem no fígado, que não retornam à garganta dos animais como outras ervas, mas sim corroem e destroem todo o fígado do animal”. Tal parasito foi mencionado novamente em ovelhas em 1523 pelo britânico Sr. Anthony Fitzherberte e pelo espanhol Conrad Gesner em 1551 em seu tratado “Historia Animalium”. As primeiras ilustrações de *Fasciola* spp. foram feitas por Francesco Redi em 1668, que recuperou helmintos de carneiros e observou as mesmas características em vermes de vesícula biliar de lebres, correlacionando a forma e o local do parasito recuperado. Atualmente, estudos mostram que a família Fasciolidae (Raillet, 1895) incorpora grandes helmintos, que parasitam os ductos biliares de animais selvagens e domésticos (ROJO-VAZQUEZ et al., 2012).

A prevalência da doença é bastante variada na Europa, sendo relatada a infecção em rebanhos bovinos na Espanha, França, Reino Unido e Itália (GONZALEZ-LANZA et al., 1989; TAYLOR, 1965) e em ovinos no Nordeste da Espanha (PAZ-SILVA et al. 2003). No norte da África, em Marrocos, a presença de *F. hepatica* foi relatada em bovinos e em cabras (TORGERSON; CLAXTON, 1999) e em bovinos na Etiópia (YILMA; MESFIN, 2000). Na China, Wang et al. (2006) encontraram uma prevalência de 28,5% de um total de 326 fígados condenados de ovinos adultos. Na América do Norte, os Estados Unidos e o Canadá também apresentam registros de fasciolose em bovinos (TORGERSON; CLAXTON, 1999).

A introdução de *F. hepatica* nas Américas decorreu da colonização humana e da capacidade de o parasito infectar os limneídeos *Galba* spp., *Fossaria* spp. e *Lymnaea* spp., ocorrendo o desenvolvimento intramolusco completo (MALEK, 1985; BARGUES

et al., 2007). Na América Latina, há registro da doença em vários países. Foi verificada uma prevalência de 1,2% de 132 amostras de fezes de humanos analisadas no município de Caujul, no Peru. Na Argentina, um estudo de um caso de fasciolose humana mostrou que dos 101 exemplares de moluscos coletados na região, dois estavam infectados por larvas de *F. hepatica* e a prevalência de infecção nos animais foi de 100% (10/10) para caprinos, 82% (9/11) para ovinos e 86% (6/7) para bovinos (RUBEL et al., 2005). APT et al. (1993) descreveram, entre janeiro de 1986 e dezembro de 1990, a prevalência da fasciolose em humanos (0,7%), equinos (13,5%), suínos (20,6%) e coelhos silvestres (6,1%), no Chile. No sudoeste do México, um estudo analisou 1.199 amostras fecais de caprinos e encontrou uma prevalência de 24,5% positivas e das 381 amostras fecais de ovinos a prevalência foi de 19,4% positivas (MUNGUÍA-XÓCHIHUA et al., 2007).

No Brasil o primeiro relato sobre o parasito ocorreu quando foi encontrado *F. hepatica* em fígados de bovinos no município de Três Rios, estado do Rio de Janeiro (LUTZ, 1921). A partir disso, os estudos foram baseados, principalmente, na ocorrência e prevalência da doença em bovinos abatidos em frigoríficos. No Rio Grande do Sul, Oliveira (1932) examinou 158.467 fígados de bovinos originários de dezesseis municípios diferentes abatidos em frigorífico, mostrando uma prevalência de 11,8%. Em meados da década de 1970, segundo Honer (1979), o problema da fasciolose no país, nessa época, apresentava dois aspectos importantes: um com relação à dispersão, na região centro-sul, onde a fasciolose ocorria nas criações intensivas de gado de leite, e o outro na região Sul, área que apresentava maior ocorrência no Brasil, onde a doença estava presente em rebanhos de criações extensivas de gado de corte. Nesse mesmo período, outra área que começou a chamar atenção foi à região sudeste, no Vale do Paraíba, estado de São Paulo. Um estudo helmintológico em animais de pequenos produtores realizado no município de Itajaí (RJ) mostrou a presença de ovos de *F. hepatica* em 100% dos animais amostrados, como ovinos, caprinos e equinos, explorados em pastejo consorciado. Segundo os autores, este é o primeiro caso da doença nos animais mencionados na região Sudeste do Brasil (SANTOS et al., 2000). Outro estudo, realizado por Pile et al. (2000) no município de Maricá, também no RJ, identificou a presença de ovos do parasito nas fezes de búfalos jovens e adultos utilizando a técnica de Quatro Tamises, com índice de ocorrência de 2,5%.

No Espírito Santo, Bernardo et al. (2011) avaliaram as perdas econômicas e a porcentagem de condenação devido a fasciolose no estado. Observaram, ao analisar dados oriundos de um matadouro localizado no município de Atilio Vivacqua, que a

prevalência de condenação aumentou consideravelmente entre os anos de 2006 e 2009, sendo em 2006 de 15,24%, em 2007 de 23,93%, em 2008 de 28,57% e em 2009 de 28,24%, em um total de 110.956 bovinos abatidos nesse período. Em outro estudo, dados também coletados de um matadouro do município de Atílio Vivacqua (ES) durante os anos de 2008, 2009 e 2010 mostraram que de 102.492 bovinos abatidos e inspecionados, 43,5% apresentaram lesões ou alterações hepáticas diagnosticadas, sendo que 27,04% foram decorrentes da fasciolose (VIEIRA et al., 2011).

Em Minas Gerais vêm sendo reportada a incidência de fasciolose animal, principalmente em bovinos, com dados de propriedades, frigoríficos, serviços de inspeção e por meio de exames coproparasitológicos. Os registros do parasito aparecem de forma isolada, sendo que alguns municípios do sul do estado são considerados área enzoóticas para a fasciolose bovina. Nos últimos anos, têm sido relatados novos casos de bovinos em municípios da região metropolitana de Belo Horizonte, como Pedro Leopoldo, São José da Lapa e Confins, até então sem registros da doença, indicando novas áreas de transmissão do helminto. Não foram, até o momento, registrados casos de fasciolose humana em Minas Gerais, não obstante, esse fato deve ser descartado visto que, estudos na literatura já evidenciaram moluscos e bovinos infectados por *F. hepatica* (LIMA et al., 2009; DRACZ e LIMA, 2014; DRACZ et al., 2016). Carvalho (1940) relatou à primeira ocorrência de *F. hepatica* em bovino da raça holandesa sem procedência definida, enviado ao município de Viçosa, pela Secretaria da Agricultura - MG. Até o ano de 1988 a literatura mostrou a presença de focos de *F. hepatica* apenas na região do vale do rio Paraíba, abrangendo os Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, na fronteira com MG, sendo desconhecida a existência de casos seguramente autóctones nesse último Estado (DACAL et al., 1988). Os autores Caldas et al., (1995) obtiveram em torno de 1,5% de amostras positivas para *F. hepatica* examinadas a partir de 3.086 bovinos de seis mesorregiões de MG, sendo que a maior prevalência ocorreu no município de Itajubá (9,05%). Lima et al., (2009) observaram que 70% dos bovinos examinados na região de Itajubá apresentavam ovos de *F. hepatica* nas fezes e dos 135 *L. columella* coletados no município, 2,96% dos moluscos abrigavam formas larvais de *F. hepatica*. Esses autores constataram *F. hepatica* em bovinos de 16 dos 120 municípios de MG pesquisados, em um total de 1.251 amostras de fezes. Na região do vetor Norte do município de Belo Horizonte - MG, Dracz e Lima (2014) encontraram de um total de 250 amostras de fezes (176 de bovinos e 74 de bubalinos) provenientes dos municípios de São José da Lapa e Pedro Leopoldo, 54 animais positivos para *F.*

hepatica, sendo 33 bovinos (18,75%) e 21 bubalinos (28,37%). Silva et al., (1994) realizaram o primeiro registro de *L. columella* naturalmente infectadas por *F. hepatica* em Várzeas do município de Itajubá. Na mesma localidade, Coelho e Lima (2003) relataram que de um total de 626 espécimes de *L. columella* coletado entre os anos de 1999 e 2000, ocorreram maiores prevalências do molusco infectado entre os meses de setembro de 1999 (5,2%) e julho de 2000 (3,9%). Dando continuidade aos trabalhos na região do município de Itajubá, Coelho, (2007) estudou a dinâmica populacional de *L. columella* entre os anos de 2003 e 2006 e relatou uma prevalência média de moluscos positivos para *F. hepatica* de 1,7%, sendo que a maior prevalência (18,8%) ocorreu no mês de dezembro de 2004. Lima et al., (2009) encontraram ovos de *F. hepatica* nas fezes de bovinos em 16 dos 120 municípios pesquisados sendo que em Itajubá, área enzoótica de *F. hepatica*, 70% dos bovinos e 2,96% de espécimes de *L. columella*, amostrados na região do município estavam infectados.

2.4 Casos de fasciolose humana no Brasil

Os primeiros casos de fasciolose humana no Brasil foram descritos por Rey. Entretanto em 1957 houve uma suspeita do primeiro caso, porém não houve comprovação da ocorrência de caso humano de infecção por *F. hepatica* no estado do Rio Grande do Sul. Um ano depois, este mesmo autor, assinalou o primeiro caso de fasciolose humana no país. Em 1958, Rey et al., descreveram o primeiro caso de fasciolose humana em uma criança de três anos, em Campo Grande, Mato Grosso.

Ainda na época das notificações dos primeiros casos de fasciolose humana no país, dois casos foram confirmados no nordeste brasileiro, precisamente no município de Ilhéus na Bahia no ano de 1967 por Santos (apud CORREA; FLEURY, 1971). A controvérsia neste fato é que as literaturas pesquisadas divergem se tais casos são autóctones, ou seja, se a infecção se deu realmente na localidade onde os pacientes habitavam. Correa e Fleury (1971) foram alguns dos primeiros autores a se referirem às ocorrências de Ilhéus como casos autóctones. Posteriormente, Guimarães (2016) afirmaram que os casos isolados de Ilhéus eram não autóctones, e desse modo, a infecção pelo parasito não se deu no local onde os pacientes habitavam, podendo estes terem contraído o parasito em outro lugar. Enquanto a dúvida persiste, há indícios na literatura de que o argumento de Guimarães (2016) é o mais consistente, considerando que a disponibilidade dos moluscos limneídeos é fator primordial para a ocorrência de

fasciolose. Contudo, o primeiro registro de um limneídeo para o nordeste só ocorreu em 1985 em Salvador, Estado da Bahia, cerca de dezoito anos após os casos de Ilhéus (PARAENSE, 1983; 1986). Além disso, a literatura consultada não menciona casos de fasciolose animal na Bahia.

Em 1965 Santos e Vieira elevaram para oito as citações de ocorrência de fasciolose humana no Brasil ao divulgarem o achado de sete novos casos no Vale do Rio Paraíba. Os autores salientaram ainda, a alta incidência de *F. hepatica* no gado bovino (10%) nesta mesma região. Este estudo foi realizado entre 5/10/1966 e 23/3/1967. Os doentes autóctones com residência em área endêmica de fasciolose bovina, há trinta anos. Os autores sugerem que a forma de transmissão pode ter sido devido às condições mantidas pela população humana da região, consumindo folhas de agrião dos cultivos existentes e por meio de águas contaminadas de córregos e valetas que muitos camponeses costumavam beber, quando em serviço de campo. Todos os doentes tiveram o diagnóstico inicial por meio do exame de fezes. Posteriormente, foi feita a confirmação da parasitose pelo encontro dos ovos de *F.hepatica* na bile, obtida por tubagem duodenal, e ainda, por meio de novos exames de fezes, nos quais foram utilizados os métodos de Willis et al., (1921), Faust et al., (1938) e Hoffman-Pons-Janer (1934).

Amaral e Busetiet em 1979, relataram um casal parasitado por *F. hepatica* no bairro Uberaba em um município da cidade de Curitiba. Os pacientes foram encaminhados ao laboratório de parasitologia do hospital das clínicas da Universidade Federal do Paraná. O diagnóstico foi feito por meio de sondagem duodenal, onde foram encontrados os ovos do parasito. Após esse achado foi feito um inquérito de 166 pacientes, moradores do bairro Uberaba. Foram obtidas amostras fecais desses pacientes para realização do exame coproparasitológico. A incidência de *F. hepatica* foi de 4,8 %, não sendo uma porcentagem real, visto que, o bairro possuía 25.579 habitantes, entretanto esse estudo comprova humanos infectados em mais um estado do nosso país.

Baranski et al., (1977), no Paraná, descreveram o 15º caso de infecção humana por *F. hepatica* no brasil, precisando em 14, o número de casos autóctones em nosso país.

Um estudo realizado por Pile et al., (2000) por meio de resultados de exames coprológicos realizados em pacientes atendidos em postos de saúde e hospitais do município de Volta Redonda, assinalou a primeira ocorrência da fasciolose humana no Estado do Rio de Janeiro. O resultado do exame das 500 amostras mostrou positividade

para ovos de *F. hepatica* em dois indivíduos, registrando um coeficiente de ocorrência de 0,4%.

Em 2004, Igreja et al., relataram dois casos de fasciolose humana ocorridos em área rural do Estado do Rio de Janeiro. Durante 12 anos os autores realizaram inquéritos coprológicos nos municípios de Sumidouro e Paracambi, em busca de casos de esquistossomose. Foram realizados cerca de 20.000 exames em 4.000 pessoas (algumas delas examinadas mais de uma vez) pelos métodos de Hoffman e Kato-Katz, com até três amostras por pessoa obtidas em dias diferentes e quatro lâminas por amostra. O primeiro caso, diagnosticado em 2001, em Paracambi, era um agricultor de 32 anos, com história de etilismo, positivo em duas amostras, que se queixava de tonteiras e recusou o tratamento para a fasciolose. O outro caso foi diagnosticado em 2003, em Sumidouro, em uma das amostras de fezes de uma dona de casa de 48 anos, com hábito de comer vegetais crus cultivados no município, além disso, criava bovinos e outros animais, queixava-se de tonteira, cansaço e tosse.

Em 2007, Coral et al., relataram uma paciente com 53 anos, agricultora, procedente da zona rural do Rio Grande do Sul, que se queixava de episódios repetidos de dor no hipocôndrio direito, associados a náuseas e vômitos, icterícia flutuante, colúria e acolia, bem como astenia e tontura. Aos exames laboratoriais, apresentava anemia persistente e eosinofilia. Foi submetida à colecistectomia, que identificou 25 espécimes do parasito *F. hepatica* nos ductos biliares. Após procedimento cirúrgico a paciente foi orientada ao tratamento com bitionol permanecendo assintomática no sexto mês pós-operatório.

Oliveira et al., em 2007, juntamente com a comissão de vigilância epidemiológica do Município de Canutama, no Estado do Amazonas, notificaram a ocorrência de um surto de fasciolose humana. Como parte da investigação do surto, realizou-se um inquérito parasitológico de fezes, no período de 21 a 30 de maio de 2005, com delineamento transversal, na área urbana do Município. A prevalência encontrada para *F. hepatica* foi de 2,0% (11/558). Anteriormente em 13 de maio de 2005, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) foi notificada, pela Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (FVS/AM), da ocorrência de sete pacientes com amostras de fezes com estruturas semelhantes a ovos de *Fasciola hepatica*, identificados no laboratório do Hospital do Município de Canutama/AM; quatro amostras foram, também, confirmadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amazonas (Lacen/AM). A presença de casos de

fasciolose no Município de Canutama, Amazonas, é uma ocorrência inusitada; não há registros anteriores da identificação dessa parasitose no Estado do Amazonas, ou mesmo na Região Norte e a presença de hospedeiros intermediários e/ou hospedeiro-reservatórios animais ainda é desconhecida.

Em 2013, após o surto de fasciolose registrado no estado do Amazonas, Maciel et al., realizaram um levantamento sorológico transversal da fasciolose humana no município de Canutama, na Amazônia Ocidental. As investigações sorológicas e coprológicas da população estudada foram realizadas em agosto de 2013, selecionando uma em cada seis casas em uma área de várzea na área urbana da cidade, incluindo amostras de indivíduos de 2 a 86 anos de idade. Um total de 434 amostras humanas foram incluídas no estudo, das quais 36 (8,3%) foram reativas por ELISA e 8 (1,8%) foram reativas no *Western blot*. Ovos de *F. hepatica* foram encontrados em uma amostra humana.

2.5 Patologia da fasciolose

A patogênese da fasciolose pode ser compreendida a partir da ingestão das metacercárias, com desencistamento do parasito jovem no intestino delgado, local onde ocorre a primeira interação entre o parasito e os tecidos do hospedeiro, sendo diretamente associada à espécie de hospedeiro definitivo infectado, à carga parasitária e às características bioquímicas do parasito durante os diferentes estágios de seu desenvolvimento (BORAY, 1967; BEHM; SANGSTER, 1999).

A migração de *F. hepatica* pelo organismo do hospedeiro definitivo inicia-se quando as metacercárias desencistam-se, rompendo as camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa do intestino delgado, alcançando a cavidade peritoneal. As formas imaturas continuam migrando entre vários órgãos da cavidade peritoneal até chegarem ao fígado (BORAY, 1969).

Após os parasitos jovens alcançarem o fígado, penetram na cápsula hepática e dão início a um processo de migração pelo parênquima. A ação mecânica das ventosas oral e ventral, a abrasão causada pelos espinhos presentes no tegumento, a alimentação e a liberação de proteases durante a migração no parênquima são responsáveis pela destruição de hepatócitos, de vasos sanguíneos e de ductos biliares, provocando micro hemorragias e danos decorrentes da resposta inflamatória do hospedeiro à presença do

parasito e seus metabólitos excreto-secretados (DAWES, 1963a; BEHM; SANGSTER, 1999).

Ao longo das áreas dos tecidos por onde o parasito passou podem ser encontrados restos celulares, hemácias, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Em lesões mais antigas é possível encontrar macrófagos e fibroblastos formando granulações fibróticas, que tornam o tecido enrijecido. Entre a primeira e terceira semana após a infecção, os danos no fígado se limitam ao caminho percorrido pelas formas imaturas do parasito. Ocorre degeneração de hepatócitos, hemorragia subcapsular, presença de infiltrados eosinofílicos nas áreas percorridas pelo parasito e, nos tecidos adjacentes, são encontrados eosinófilos e macrófagos. Nesta fase, poucos sinais ou sintomas clínicos são observados ou relatados em hospedeiros naturais. Com a continuidade da infecção, pode-se observar que o infiltrado inflamatório presente tem um aumento na diversidade de células que o compõe e regiões de fibrose começam a ser formadas nas áreas de lesões (BEHM; SANGSTER, 1999).

Em humanos, assim como nos demais hospedeiros definitivos, a fase aguda da infecção por *F. hepatica* é caracterizada pela penetração do parasito jovem no parênquima hepático e pela migração do mesmo por meio do fígado em busca dos canais biliares. Ao alcançar os ductos o parasito termina seu desenvolvimento e inicia a postura de ovos, caracterizando a fase crônica da infecção (PILE et al., 2000; IGREJA et al., 2004; AKSOY et al., 2005).

Em camundongos, as metacercárias desencistam-se após a ingestão e as formas jovens podem ser encontradas aderidas à parede do intestino delgado. Áreas de hemorragia decorrentes da penetração do parasito na parede do intestino podem ser observadas e uma extensa destruição de fibras musculares indica uma possível migração do helminto ao longo do órgão. Pode ocorrer morte súbita devido à extensa hemorragia hepática, já que o parasito pode entrar e sair do fígado várias vezes na fase migratória da infecção, e durante esse deslocamento, provocar o rompimento de vasos sanguíneos. Os parasitos adultos provocam ulceração na parede dos ductos, porém sem provocar hemorragia e há hiperplasia do epitélio dos ductos biliares (DAWES, 1963b). Em casos de infecção maciça, pode haver ruptura da cápsula hepática acompanhada de hemorragia para a cavidade peritoneal, o que pode resultar em óbito, sem sinais clínicos aparentes. Os casos de morte do hospedeiro nesta fase, chamada de fase aguda ou fase hepática da infecção, é, portanto, consequência destas ações do parasito no fígado e das respostas do organismo a sua presença (BEHM; SANGSTER, 1999).

Ao alcançar os ductos e vesícula biliares do hospedeiro definitivo, os parasitos ali localizados terminam o seu desenvolvimento em adultos, iniciando a postura de ovos. No início desta fase, denominada fase crônica, é relatado o encontro de um pequeno infiltrado inflamatório local. Podem ocorrer descamação e ulceração provocadas pelos espinhos e ventosas nos ductos biliares, com infiltração de várias células, incluindo fibroblastos, diretamente relacionados aos processos de fibrose ocorridos no fígado (DAWES, 1963a). Os ductos biliares começam a dilatar-se, resultando em hiperplasia dos mesmos e entre 112 e 140 dias após a infecção, observa-se deposição de minerais, principalmente sais de cálcio, nas paredes dos ductos. Essas alterações culminam em hemorragia e necrose da mucosa dos ductos biliares (BORAY, 1969).

2.6 Sinais clínicos e sintomas da fasciolose

A evolução clínica da fasciolose é muito variável e depende da carga parasitária, da resposta imune do hospedeiro, da fase e da duração da infecção, entre outros (BORAY, 1967). Em estudo realizado com bovinos, Pritchard et al., (2005), confirmam que a fasciolose causa perda de peso, diarreia, diminuição da produção de leite e ocasionalmente morte nos animais infectados após confirmação da infecção por análise fecal com identificação de ovos e detecção de anticorpos no leite por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A fasciolose crônica é a forma mais comum da doença e cursa com infertilidade (OAKLEY et al., 1979; CHARLIER et al., 2007), anemia, perda de peso, queda na produção e condenação do fígado ao abate (FOREYT, 2005).

Em ovinos, os sinais clínicos característicos são dor abdominal à apalpação, anemia, perda de peso, hepatomegalia e febre, resultantes das lesões causadas pela migração dos parasitos jovens por meio do parênquima hepático. Nos casos de alta carga parasitária, associada à ingestão de grande quantidade de metacercárias em um curto período de tempo, os estágios imaturos podem causar a morte súbita na fase aguda por hepatite traumática, (BORAY, 1967; ROJO-VAZQUEZ et al., 2012). Ainda nesta fase, a observação minuciosa do rebanho de ovinos permite a identificação de outros sinais clínicos, como mucosas pálidas, letargia, dispneia quando em movimento, fígado palpável e ascite (ROJO-VAZQUEZ et al., 2012). Na fasciolose crônica, há perda de peso, ascite, desenvolvimento gradual de edema submandibular, anemia, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, elevada atividade enzimática no fígado, eosinofilia

e, em casos de cargas parasitárias muito altas, a infecção pode levar o animal à morte (BEHM; SANGSTER, 1999).

Em humanos, a fase aguda da infecção por *F. hepatica*, também conhecida como fase hepática ou invasiva, apresenta sintomas clássicos como febre, urticária, dor intermitente na parte superior direita do abdômen, hepatomegalia e eosinofilia. Outras alterações que podem ser observadas são hepatite, hemorragia subcapsular e necrose hepática. Na fase crônica, os sintomas mais comuns são dor intermitente no quadrante abdominal superior (PILE et al., 2000; IGREJA et al., 2004; AKSOY et al., 2005). Há perda de peso, ascite, desenvolvimento gradual de edema submandibular, anemia, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, elevada atividade enzimática no fígado, eosinofilia e em cargas parasitárias muito altas, a infecção pode levar o hospedeiro à morte (BEHM; SANGSTER, 1999).

2.7 Controle da fasciolose

Métodos na prevenção e controle da fasciolose podem ser aplicados tanto para os hospedeiros definitivos quanto para os hospedeiros intermediários. Inicialmente o controle utilizado nos hospedeiros definitivos é o tratamento dos animais infectados com fármacos. No mercado existem quatro grupos de anti-helmínticos com ação fasciolicidas, que são: fenóis halogenados (nitroxinil), salicilanilidas (closantel e oxiclozanida), as sulfonamidas (clorsulon) e os benzimidazóis (triclabendazol e albendazol). Apenas três desses fármacos têm atividade adulticida e larvicida ao mesmo tempo (nitroxinil, closantel e triclabendazol), as outras têm atividade adulticida (ROBERTS; SUHARDONO, 1996; BRENNAN et al., 2007; COSTA, 2010).

Contudo, técnicas de drenagem, construção de bebedouros, cercas no entorno de áreas alagáveis, podem contribuir para diminuição do contato do rebanho com metacercárias (RIBEIRO, 2016).

2.8 Hipoclorito de sódio (NaClO), propriedades químicas e uso nas desinfecções de produtos alimentícios

A fasciolose é uma zoonose incluída na lista de doenças transmitidas por alimentos (DTA), e em alguns países da América Latina, como Brasil, o sistema nacional de vigilância epidemiológica das DTAs, estimuladas por recomendações e acordos internacionais tem controlado a limpeza e desinfecção dos alimentos com

fiscalização da preparação, fabricação e transporte dos alimentos conforme definido na VII Reunião Interamericana de Saúde Ambiental de Nível Ministerial (RIMSA) e na XXXV Reunião do Conselho Diretor da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (MORETTI, 2007, Ministério da Saúde, 2010). No entanto, essas recomendações ainda são poucos evidentes para o controle da fasciolose.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, e a Resolução RDC nº59, de 17 de dezembro de 2010, a prática de desinfecção de hortifrutícolas utilizando hipoclorito de sódio pode eliminar microrganismos, podendo assim, garantir alimento seguro e auxílio no controle de infecções (MORETTI, 2007). Entretanto, inexistem estudos que avaliam ação hipoclorito de sódio sobre metacercárias de *F. hepatica*.

O hipoclorito de sódio, conhecido comercialmente como água sanitária é utilizado popularmente na proporção de 20 mL do produto diluídos em 1000 mL de água para desinfecção de vegetais. Esse composto químico possui fórmula química NaClO e atua como ácidos graxos degradador de solventes gordurosos, reduzindo a tensão superficial da solução remanescente, sendo capaz de formar uma reação de saponificação. Esse agente químico também possui a capacidade de neutralizar aminoácidos, formando água e sal, em uma reação de neutralização. Essa reação ocorre com a saída dos íons de hidroxila, permitindo uma redução de pH. O ácido hipocloroso (HOCl-), substância presente na solução hipoclorito de sódio e íons de hipoclorito (OCl) levam a degradação de aminoácidos e hidrólise que interferem no metabolismo celular. Por esses motivos o hipoclorito de sódio é normalmente utilizado nas desinfecções de alimentos e outras superfícies, devido a elevada capacidade oxidante. Estudos comprovam a ação antimicrobiana desse agente químico, inibindo enzimas bacterianas a partir de uma oxidação irreversível de grupos SH (grupo sulfidrilo) de enzimas bacterianas essenciais (ESTRELA et al., 2002).

Silva (2017) avaliou o efeito antiparasitário de PuryVitta (hipoclorito de sódio 0,96% p/p de cloro ativo) e Qboa (Hipoclorito de sódio e teor de cloro ativo 2,0% a 2,5% p/p). O sanitizante da marca Qboa foi o que apresentou menor percentual, nas respectivas dosagens indicadas pelos fabricantes, para matar larvas infectivas de *Strongyloides venezuelensis*. Os resultados evidenciam que os sanitizantes contendo o princípio ativo de hipoclorito de sódio utilizados nas concentrações de um mL/L por 15 min do Hidroesteril, de 6 mL/L durante 5 min de PuryVitta, e 0,2 mL/L por 30 min de Qboa, não possuem eficácia na morte das larvas, todavia esses produtos apenas

apresentam 100% de eficácia sobre larvas de *S. venezuelensis* quando utilizados puros sem diluição, o que é inviável devido à ação deles sobre o vegetal degradando-o.

A confirmação da ação de hipoclorito de sódio sobre metacercárias de *F. hepatica* é de fundamental importância, visto que, essa parasitose está em expansão por todo país e os conhecimentos produzidos poderão auxiliar o controle da doença humana, reforçando informações como descrito na lei nº 11.346 no Art. 2º afirma que “a alimentação adequada é direito fundamental do ser humano, [...] devendo o poder público adotar as políticas e ações que se façam necessárias para promover e garantir a segurança alimentar e nutricional da população”.

3 JUSTIFICATIVA

O cenário mundial da fasciolose humana é preocupante, essa helmintose é emergente em vários locais, inclusive em todas as regiões brasileiras. Estima-se que milhares de pessoas estão sob risco de ingerir acidentalmente metacercárias do parasito em 51 países das Américas, Europa, África, Ásia e Oceania. Aproximadamente dois meses após a ingestão de metacercárias inicia-se a eliminação de ovos nas fezes pelos humanos, sendo essa doença considerada de evolução crônica e de difícil diagnóstico. Considerando que a transmissão dessa parasitose está intimamente associada ao consumo de produtos hortifrutigranjeiros contaminados com metacercárias, e que existem poucas pesquisas que comprovam a eficácia de produtos químicos sobre essa forma de resistência do parasito, estudos que evidenciem a ação de agentes desinfetantes para inativar metacercárias de *F. hepatica* são necessários, como o protocolo de hipoclorito de sódio (NaClO), recomendado pela OMS e ANVISA.

Acredita-se que, uma vez identificado produtos anti-metacercárias de *F. hepatica*, será rompido um elo fundamental para sucesso do ciclo biológico do parasito, sendo assim, ações de educação em saúde atuarão como um fator de prevenção e controle da infecção humana.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar a ação do hipoclorito de sódio (NaClO) nas concentrações 0,2%; 0,02% e 0,002% sobre metacercárias de *Fasciola hepatica*.

4.2 Objetivos Específicos

- Observar a viabilidade e a infectividade das metacercárias de *F. hepatica* em camundongos da linhagem C57BL/6J após tratamento com NaClO nas concentrações 0,2%; 0,02% e 0,002%;
- Avaliação macroscópica e histopatológica das lesões hepáticas induzidas pela infecção por *F. hepatica* em camundongos C57BL/6J, após infecção com metacercárias tratadas com NaClO nas concentrações 0,2%; 0,02 e 0,002%;
- Recuperar parasitos durante as necropsias dos camundongos infectados com metacercárias de *F. hepatica*;
- Analisar a morfologia das metacercárias de *F. hepatica* por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5 MATERIAIS E METODOLOGIA

5.1 Manutenção de *Galba cubensis* em laboratório

Foram utilizados espécimes de *Galba cubensis* criados no Laboratório de Helminologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LabHelVet-ICB-UFMG), os moluscos foram mantidos em temperatura ambiente (23 °C), em aquários de vidro de (18x24x49cm) contendo 13 litros de água isenta de cloro, dois fragmentos de isopor, na medida de 4x4x1 cm para a postura de ovos. Os aquários são cobertos com telas de malha de três mm, presas com elástico. A “limpeza dos aquários foi realizada semanalmente por sucção com auxílio de uma mangueira de medida ¼” 2,5 mm. A água foi repostada pelo sistema automatizado com auxílio de uma boia. Os moluscos foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa ad libitum*), livre de pesticida e higienizado com solução de ácido acético a 0,005%, a cada três dias. Uma vez por semana foi adicionada cerca de 200 mg de carbonato de cálcio (CaCO₃) em cada aquário.

5.2 Obtenção de ovos e miracídios de *Fasciola hepatica*

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de ovinos da raça Santa Inês infectados experimentalmente com *F. hepatica*. As fezes foram acondicionadas em sacos plásticos, transportadas em caixas de isopor em gelo até o LabHelVet-ICB/UFMG, onde foi realizado contagens de ovos por grama de fezes (OPG) pela técnica de quatro tamises descrita por Girão e Ueno (1985). As amostras de fezes foram pesadas e colocadas em um béquer, diluídas em água desclorada, homogeneizadas com auxílio de um bastão de vidro, tamisadas em um 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 três primeiros tamises retêm detritos alimentares e fibras fecais de tamanhos variados e permite à passagem dos ovos de *F. hepatica*, o último tamis (250 malhas/polegadas) retêm os ovos de *F. hepatica* que medem de 130-150 µm de comprimento e 63-90 µm de largura. Os ovos retidos no último tamis foram recolhidos em copo plástico, por meio de jato de água no sentido oposto ao da lavagem e posteriormente contados em microscópio estereoscópio no aumento de 25x.

Os ovos foram transferidos para placas de Petri e incubados em estufa a 27°C. Após o 8º dia de incubação foram examinadas diariamente em microscópio estereoscópio, para acompanhar o desenvolvimento dos miracídios no interior dos ovos.

5.3 Infecção experimental de *Galba cubensis* por *Fasciola hepatica* e obtenção das metacercárias

Após eclosão dos miracídios, esses foram coletados com auxílio pipeta de Pasteur para infectar (n=1000) *G. cubensis* com comprimento de 3-5 mm de concha. Cada molusco foi colocado individualmente em poços de placa de poliestireno (FALCON 3047) contendo dois mL de água desclorada adicionado dois miracídios. As placas foram expostas a foco de luz a uma distância de 60 cm por um período de 24 horas. Em seguida os moluscos foram transferidos e mantidos em aquários conforme o item 5.1. Ao 40º dia após infecção (dpi), os moluscos foram retirados dos aquários e colocados em placas de Petri. Nas placas de Petri foi adicionado filme plástico (Parafilm®, Laboratory Film – American National Can™) em toda sua superfície e pequenos fragmentos de alface fresca para facilitar o encistamento e a recuperação das metacercárias. As placas foram expostas a um foco de luz a uma distância de 50 cm por duas horas por dia, para estimular a eliminação de cercárias. Após 48 horas o encistamento as metacercárias foram quantificadas e armazenadas em tubos Falcon de 15 mL com água desclorada em geladeira a 4°C e foram utilizadas nos protocolos abaixo.

5.4 Teste com hipoclorito de sódio (NaClO)

Foram observados quatro grupos: **Grupo I** (NaClO na concentração de 0,2%, 10 x mais concentrada do que a recomendada pela ANVISA); **Grupo II** (NaClO na concentração de 0,02% recomendada pela ANVISA); **Grupo III** (NaClO na concentração de 0,002%, 10 x menos concentrada do que recomendada pela ANVISA) e **Grupo IV** (H₂O + metacercárias não tratadas com NaClO). Foram utilizadas 500 metacercárias; 125 metacercárias/grupo, estas foram adicionadas em um mL de solução de cada concentração de NaClO e incubadas em câmara úmida com temperatura de 25°C por 15 minutos. Para esse estudo foi utilizado o hipoclorito de sódio, solução aquosa corrosiva, da marca: SULFAL, lote: 314399, vendida na concentração de \geq 10%.

5.5 Análise morfológica das metacercárias de *Fasciola hepatica* por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após o período de 15 minutos, 10 metacercárias tratadas em cada concentração de NaClO, foram fotografadas em microscópio estereoscópio 40X. Em seguida estas foram fixadas em solução paraformaldeído 4%, diluído em solução salina tamponada (PBS 1X) onde permaneceram por 48 horas a 4 °C. Em seguida foi realizada a fixação secundária no centro de microscopia da UFMG (CM-UFMG). As metacercárias foram lavadas 3x em tampão cacodilato de sódio 0,1M (10 minutos), pós-fixadas em tetróxido de ósmio aquoso (OsO₄) 1% por uma hora na presença do mesmo tampão, lavadas 3x em água destilada (10 minutos), inserido em solução ácido tânico 1% diluído em água destilada (20 minutos), desidratadas em sequência crescente de álcool etílico 30% (10 minutos), 50% (2x 10 minutos), 70% (2x 10 minutos), 80% (2x 10 minutos), 95% (2x 10 minutos), 100% (3x 10 minutos), secadas por meio de ponto crítico em CPD 020 (Balzer Union) com CO₂ líquido, montadas no suporte porta-amostras (*stub*) e metalizadas com 5 nm de Ouro. As fotografias para análise morfológica das metacercárias foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 200 – FEI.

5.6 Análise da infectividade das metacercárias em camundongos C57BL/6J

Foram utilizados quatro grupos (I, II, III e IV) de nove camundongos da linhagem C57BL/6J, fêmeas, com peso médio de 23 gramas e idade entre 12 semanas, oriundas do Biotério Central da UFMG. Os animais foram inoculados individualmente com agulha de gavage, com 10 metacercárias tratadas nas concentrações de 0,2%, 0,2% e 0,002% de NaClO, conforme aprovado pelo protocolo 181/2015 do Comitê de ética em Uso de Animais da UFMG.

Após infecção, durante um período de 91 dias após- infecção (dpi) os animais foram pesados e observados quanto aos sinais clínicos (prostração, pelo arrepiado). Camundongos que morreram durante esse período foram necropsiados. Foram realizadas análises macroscópica, coletado fragmentos dos fígados para histopatologia e recuperação de parasitos. Após 60° dpi, foram recolhidas fezes das gaiolas para contagens de ovos por grama de fezes, usando a técnica de quatro tamises, para verificar a presença de ovos de *F. hepatica*. Durante o experimento foi avaliada à curva de sobrevivência dos animais.

5.7 Necropsia e eutanásia dos animais infectados experimentalmente

Os animais que morreram ao longo do experimento foram submetidos à necropsia. Esses foram colocados em posição anatômica, em decúbito dorsal. Inicialmente foi realizada uma incisão na pele e posteriormente musculatura abdominal para visualização dos órgãos internos. Foi realizada a busca de parasitos por meio da lavagem, com solução salina 0,85%, da cavidade, do fígado e da vesícula biliar. As alterações macroscópicas foram fotografadas em microscópio estereoscópio 25x.

Para análise histopatológica das lesões foram cortados fragmentos do fígado de aproximadamente três mm de espessura do órgão e colocados em solução formalina 10% (v/v) em tubo Falcon de 15 mL, para fixação por 24 horas e posteriormente foram feitas lâminas para avaliação das lesões. As lâminas foram processadas e coradas pelas técnicas histológicas de Hematoxilina-Eosina (HE). O restante do órgão foi também adicionado em placa de Petri com solução salina e macerado para observação de possível eliminação de parasitos. Após o procedimento de necropsia as carcaças dos animais foram descartadas. Animais sobreviventes após o 91° dpi, foram submetidos a três consecutivas contagens de OPG.

No 94° dpi os animais que sobreviveram e foram OPG negativos, foram eutanasiados. Estes foram anestesiados utilizando cloridrato de cetamina 150mg/kg/animal (Ketamina Agener®, Agener União, BRASIL) associado ao cloridrato de xilazina 10mg/kg/animal (Calmium®, Agener União, BRASIL). Em seguida, os animais foram submetidos ao deslocamento cervical. Para esses animais também foi realizada avaliação macroscópica, análise histopatológica das lesões e busca de parasitos.

5.8 Histopatologia hepática

Após o período de fixação dos fragmentos do fígado, esses foram lavados em água corrente durante três horas e colocadas em solução álcool 70% (v/v). Posterior à fixação em álcool, às amostras foram transferidas para cassetes de processamento. Os fragmentos foram identificados e submetidos à desidratação gradual em uma bateria de soluções alcoólicas e xilol e em seguida realizada a inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo com espessura de quatro µm para posterior montagem em lâminas de vidro. Para cada amostra de fígado coletada foram cortadas três secções, coradas em HE e as demais guardadas como reserva. Após a coloração, as lâminas foram montadas, examinadas e fotografadas em microscopia óptica.

5.9 Fixação dos parasitos

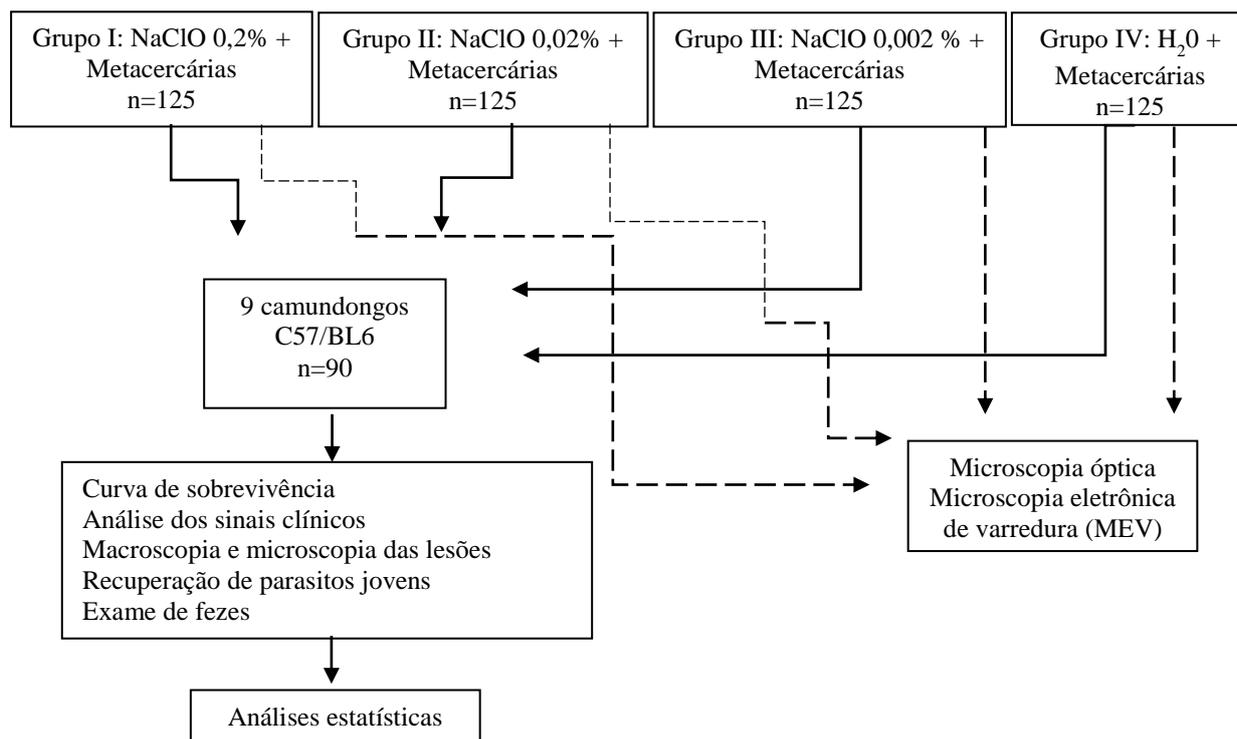
Os espécimes jovens recuperados durante a necropsia foram fixados em formol 10% por 24 horas, prensados entre lâminas e lamínulas de vidro, para facilitar a visualização das estruturas e corados com a técnica de Carmim de *Semichon* (Cable, 1969) por 24 horas. Logo após, foi realizada a desidratação destas amostras em uma série ascendente de etanóis e a clarificação foi feita em creosoto e montagem entre lâmina e lamínula com e Bálsamo do Canadá (AMATO, 1985).

5.9.1 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada no *Software Graphpad Prism 5.0*. Após teste de normalidade, os resultados foram estatisticamente analisados, utilizando-se teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. A curva de sobrevivência dos camundongos foi analisada pelos testes de Kaplan-Meier Survival Curves e Log-Rank Test.

5.9.2 Delineamento experimental

O experimento foi efetuado após aprovação pelo do CEUA/UFMG protocolo 181/2015, conforme delineamento abaixo:



6 RESULTADOS

6.1 Análise morfológica das metacercárias de *Fasciola hepatica*

Observou-se pela microscopia óptica (**Figura 2A**) e pela MEV (**Figura 2B**) que mesmo após tratamento das metacercárias com NaClO nas concentrações de 0,2%, 0,02% e 0,002% estas permaneceram preservadas.

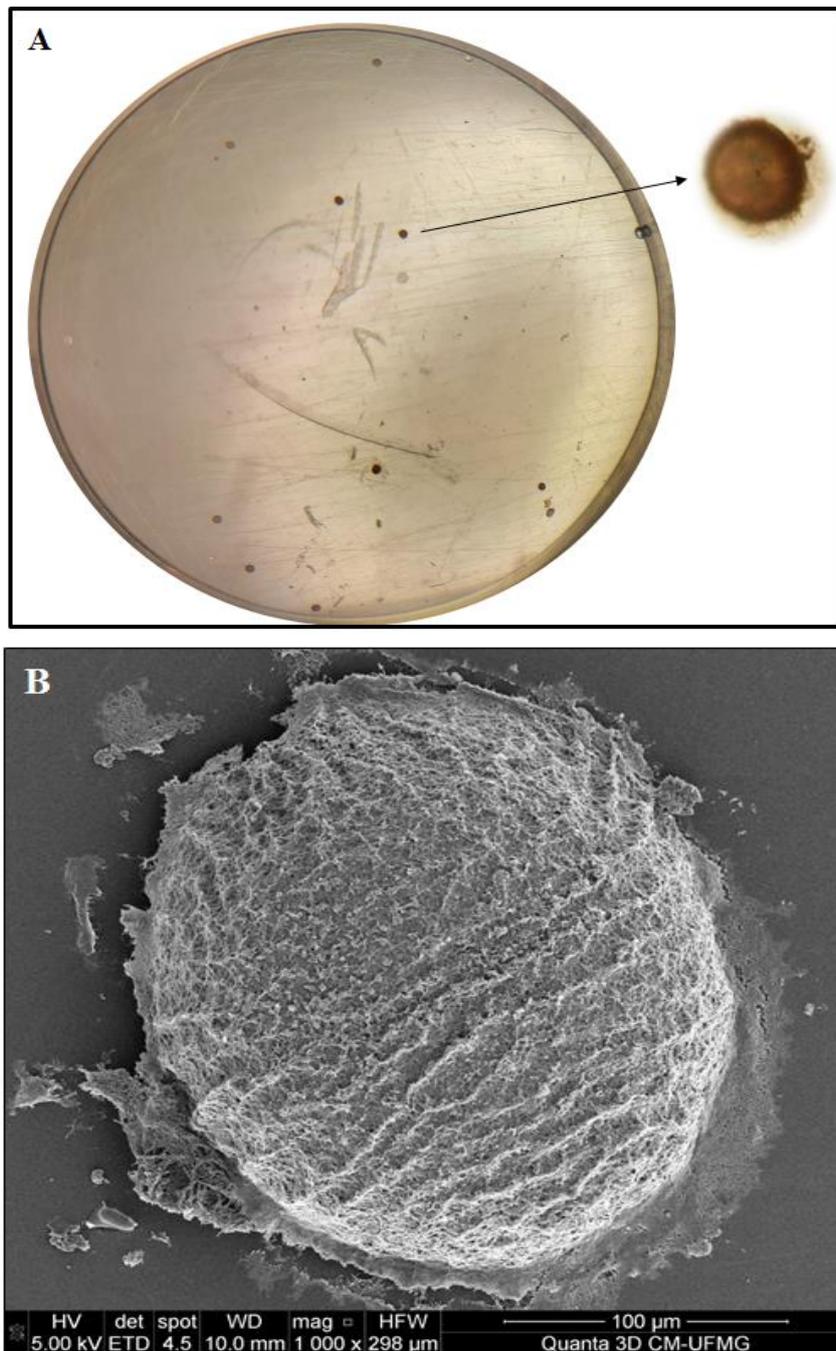


Figura 2: Foto da microscopia óptica (2A); Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura, (MEV-Quanta 3D FEG) (2B), metacercárias de *Fasciola hepatica*. Metacercárias de *F. hepatica* após tratamento com NaClO nas concentrações de 0,2% (Grupo I), 0,02% (Grupo II), 0,002% (Grupo III) e metacercárias + H₂O (Grupo IV).

Camundongos C57BL/6 infectados por *F. hepatica* foram acompanhados diariamente para a realização da curva de sobrevivência. Observou-se que na 4ª semana após-infecção (spi) morreram sete camundongos no grupo I (78% de mortalidade); no grupo II morreram oito camundongos (89% de mortalidade), nos grupos III e grupo IV, morreram sete camundongos (87% de mortalidade). Teste estatístico usado: Kaplan-Meier. Após teste não houve diferença estatística entre os grupos (**Gráfico 1**).

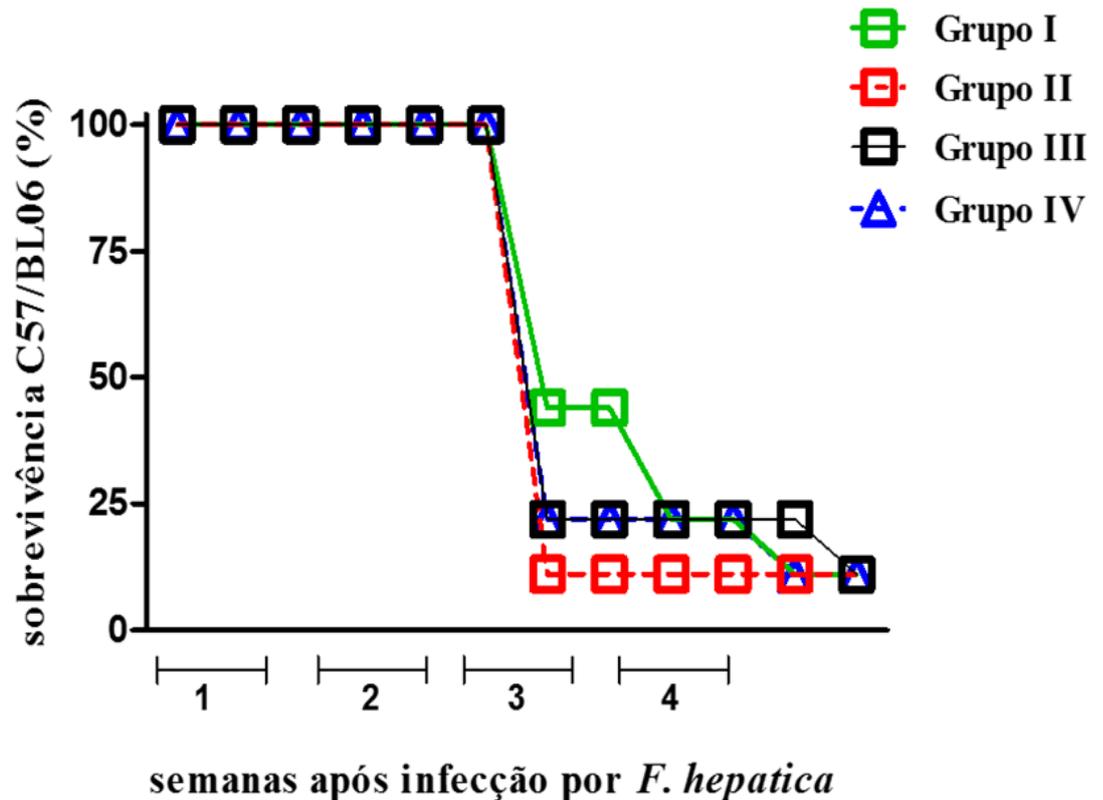


Gráfico 1: Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com 10 metacercárias de *Fasciola hepatica* tratadas com hipoclorito de sódio. **Grupo I** (NaClO na concentração de 0,2%); **Grupo II** (NaClO na concentração de 0,02%); **Grupo III** (NaClO na concentração de 0,002%); **Grupo IV** (sem tratamento prévio com NaClO).

6.2 Análise clínica dos camundongos C57BL/6 infectados por *Fasciola hepatica*

Os 36 camundongos C57BL/6J infectados para estudo da curva de sobrevivência foram acompanhados e avaliados clinicamente, diariamente durante o experimento. Foi observado que os animais de todos os grupos (I, II, III e IV) ao 20º dpi apresentaram e prostração e pelo arrepiado (**Figura 3 e Tabela 1**).

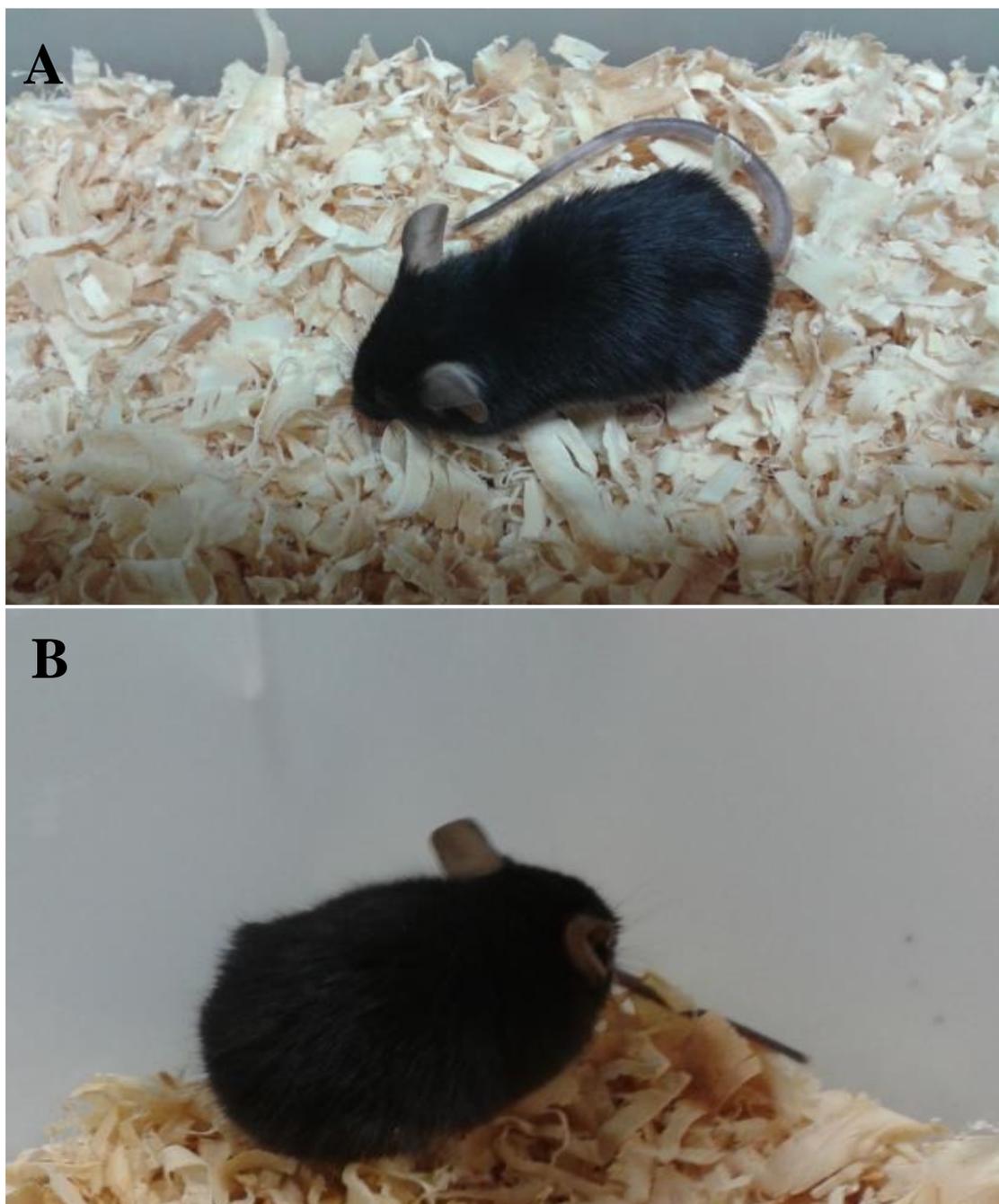


Figura 3: Camundongo C57BL/6J experimentalmente infectado por *Fasciola hepatica*. A e B: animal prostrado, com pelagem arrepiada.

Tabela 1: Análise clínica dos camundongos C57BL/6 infectados por *Fasciola hepatica*⁵⁰

Grupo I (0,2%)				
Semanas após- infecção	Início dos sinais clínicos (morte)	Sinais clínicos		
		Prostração	Dificuldade de locomoção	Pelo arrepiado
	08/07/2019(1)	+	+	+
	10/07/2019(1)	+	+	+
4 ^a	13/07/2019(3)	+	+	+
	14/07/2019(1)	+	+	+
5 ^a	20/07/2019(1)	+	+	+
6 ^a	-	-	-	-
7 ^a	01/08/2019(1)	+	+	+
Grupo II (0,02%)				
	07/07/2019(1)	+	+	+
	10/07/2019(4)	+	+	+
	11/07/2019(1)	+	+	+
4 ^a	13/07/2019(2)	+	+	+
5 ^a	-	-	-	-
6 ^a	-	-	-	-
7 ^a	-	-	-	-
Grupo III (0,002%)				
	08/07/2019(3)	+	+	+
	09/07/2019(1)	+	+	+
	10/07/2019(1)	+	+	+
	11/07/2019(1)	+	+	+
4 ^a	13/07/2019(1)	+	+	+
5 ^a	-	-	-	-
6 ^a	-	-	-	-
7 ^a	-	-	-	-
Grupo IV (H₂O + metacercárias)				
	07/07/2019(2)	+	+	+
	08/07/2019(1)	+	+	+
	11/07/2019(2)	+	+	+
4 ^a	13/07/2019(2)	+	+	+
5 ^a	-	-	-	-
6 ^a	-	-	-	-
7 ^a	-	-	-	-

6.3 Peso dos camundongos infectados por *Fasciola hepatica*

Aferiu-se o peso dos camundongos C57BL/6 semanalmente. Todos os grupos dos camundongos infectados, entre a 1^a e a 4^a semana após-infecção (spi), não apresentaram perda de peso, não sendo observada diferença estatística entre os grupos, em relação ao peso inicial, avaliando a média de peso e o \pm desvio padrão (\pm DP) (Tabela 2).

O grupo I: apresentou média de peso de 20,31g e \pm DP de 7,29 na 1^a spi; média de peso de 20,54g e \pm DP de 6,83 na 2^a spi; média de peso de 20,41g e \pm DP de 6,39 na 3^a spi e média de peso de 19,44g e \pm DP de 7,96 na 4^a spi.

O grupo II: apresentou média de peso de 20,72g e \pm DP de 7,22 na 1^aspi; média de peso de 20,81g e \pm DP de 6,80 na 2^aspi; média de peso de 20,80g e \pm DP de 6,45 na 3^aspi e média de peso de 24,00g na 4^aspi.

O grupo III: apresentou uma média de peso de 20,53g e \pm DP de 7,18 na 1^aspi; média de peso de 20,48g e \pm DP de 6,85 na 2^aspi; média de peso de 20,35 e \pm DP de 6,53 na 3^aspi e média de peso de 17,94g e \pm DP de 15,51 na 4^aspi.

O grupo IV: apresentou uma média de peso de 21,40g e \pm DP de 7,21 na 1^aspi; média de peso de 23,60g e \pm DP de 1,33 na 2^aspi; média de peso de 21,70 e \pm DP de 6,67 na 3^aspi e média de peso de 20,38g e \pm DP de 6,62 na 4^aspi. Observou-se que não há diferença estatística em relação ao peso corporal, de todos os grupos dos animais infectados.

Tabela 2: Média de peso dos camundongos C57BL/6 infectados por *Fasciola hepatica*

Grupos	Semanas após-infecção	Peso/camundongos C57/BL6									Média	DP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
GI	1°	24,80	26,59	20,33	18,80	20,60	19,00	25,00	23,00	24,00	20,31	7,29
	2°	21,77	26,75	24,30	19,45	21,00	21,15	22,00	23,00	24,00	20,54	6,83
	3°	21,34	26,48	23,76	19,23	22,16	21,51	22,30	21,90	22,50	20,41	6,39
	4°	21,34	26,48	23,76	19,05	-	-	-	-	-	22,65	2,76
GII	1°	24,15	25,32	25,71	20,70	19,80	21,60	24,90	22,10	22,00	20,72	7,22
	2°	24,80	24,20	25,33	20,76	21,27	21,40	23,99	22,50	21,90	20,81	6,80
	3°	24,00	24,50	25,80	20,72	21,09	21,90	23,00	22,40	21,60	20,80	6,45
	4°	24,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GIII	1°	24,50	21,91	25,08	19,80	23,00	21,80	25,00	24,30	19,00	20,53	7,18
	2°	25,60	23,35	21,25	20,70	23,50	22,40	23,00	25,00	18,00	20,48	6,85
	3°	25,94	23,90	20,79	20,20	22,46	21,50	22,80	25,00	18,00	20,35	6,53
	4°	25,94	23,90	-	-	-	-	-	-	-	24,82	1,02
GIV	1°	22,88	23,95	22,71	25,40	24,10	23,00	24,00	23,00	24,00	21,40	7,21
	2°	20,75	24,00	22,94	25,60	24,16	22,90	24,10	22,96	25,00	23,60	1,33
	3°	22,80	24,60	22,40	25,34	24,23	22,70	24,50	22,30	25,20	21,70	6,67
	4°	22,80	22,80	-	-	-	-	-	-	-	22,80	0,00

(-) morte

6.4 Alterações macroscópicas do fígado de camundongos infectados por *Fasciola hepatica*

Na 4ª spi foi possível observar que todos os 27 camundongos mortos apresentavam abdômen expandido, presença de sangue na cavidade abdominal e lesões hepáticas, independentemente do tratamento das metacercárias com o NaClO nas concentrações de 0,2%, 0,02%, 0,002%. Entre o 19º e 47º dpi, observou-se lesões em todos os lobos do fígado, lesões difusas com diferentes extensões, coloração esbranquiçada, lesões hemorrágicas e subcapsular que se aprofundavam no parênquima hepático, de consistência firme e focal. Foram observadas alterações na arquitetura hepática com extensas áreas lesionadas em todo o órgão, além de características necrótico-hemorrágicas, ictéricas e intumescidas (**Figuras 5, 6, 7 e 8**).

Além das lesões hepáticas, é importante salientar a observação das alterações na vesícula biliar, tais como, o aumento no volume, espessamento da parede da mesma e o escurecimento do líquido no interior da vesícula (**Figuras 5B e D**). Após as necropsias os fígados dos camundongos foram pesados e não foi observada diferença estatística na média de peso desse órgão, quando comparado os grupos dos camundongos infectados e o grupo controle (sem infecção), sendo a média do peso do grupo controle de 1,59g, média de peso do grupo I: 1,74g, média de peso do grupo II: 1,78g, média de peso do grupo III: 1,63g e média de peso do grupo IV: 1,86 g (**Figura 4**).

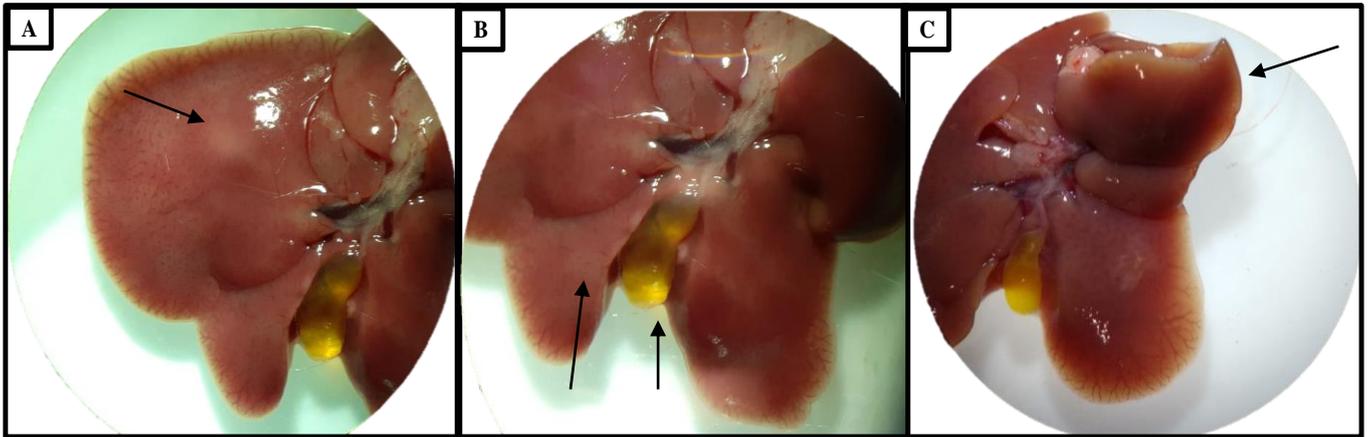


Figura 4: Grupo Controle (sem infecção) - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J em microscópio estereoscópio, aumento de 25x. A: Fígado de camundongo C57BL/6J com lobo esquerdo preservado. B: Fígado de camundongo C57BL/6J com lobo medial preservado e vesícula preservada. C: Fígado de camundongo C57BL/6J com lobo caudal preservado.

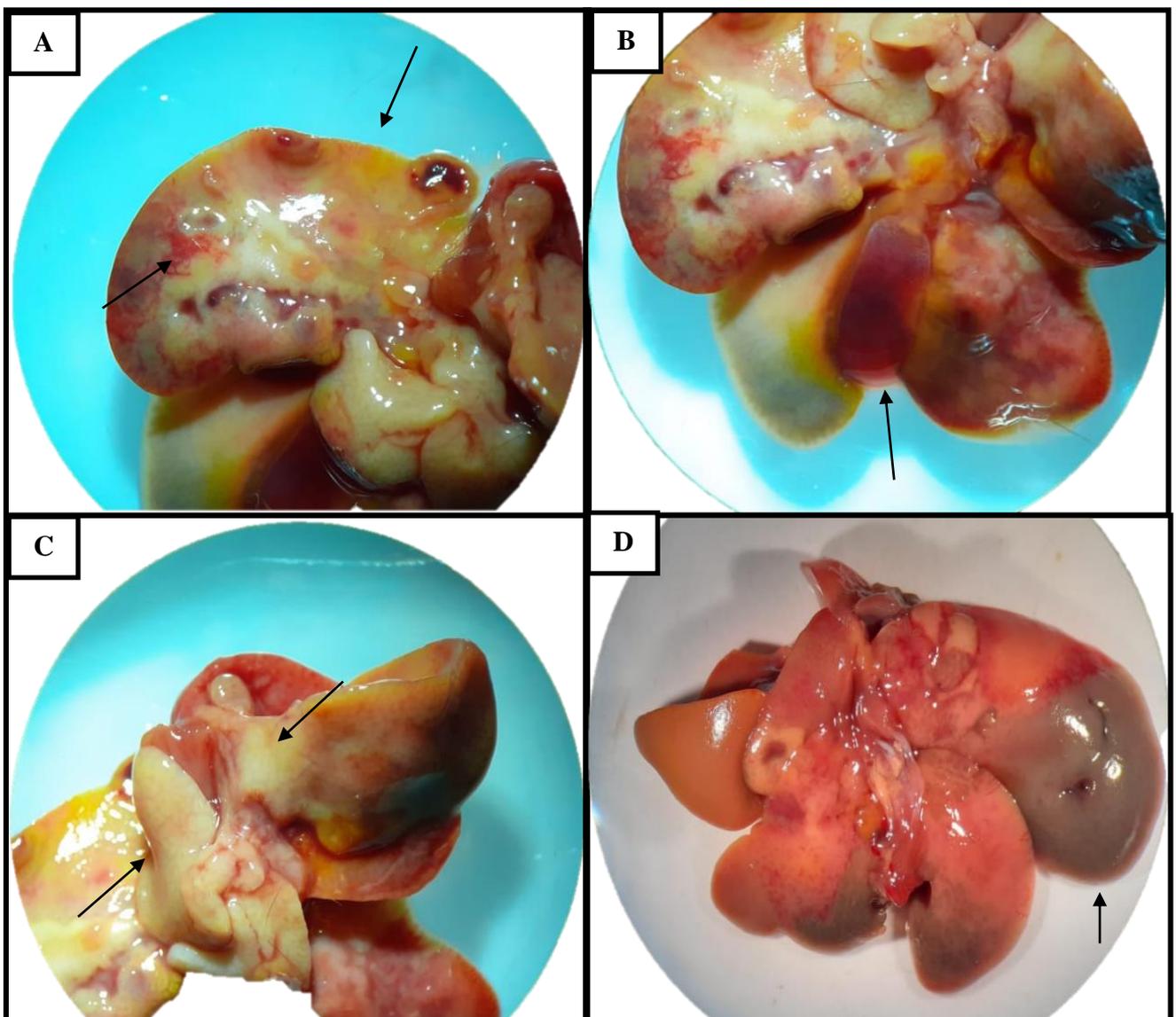


Figura 5: Grupo I - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*, em microscópio estereoscópio aumento de 25x. A: Fígado, lobo esquerdo; lesão hemorrágica e icterica (seta preta). B: Fígado, lobo medial; vesícula com tamanho aumentado (seta preta). C: Fígado, lobo caudal; área de lesão extensa esbranquiçada (seta preta). D: Fígado com áreas de necrose em lobo esquerdo (seta preta).

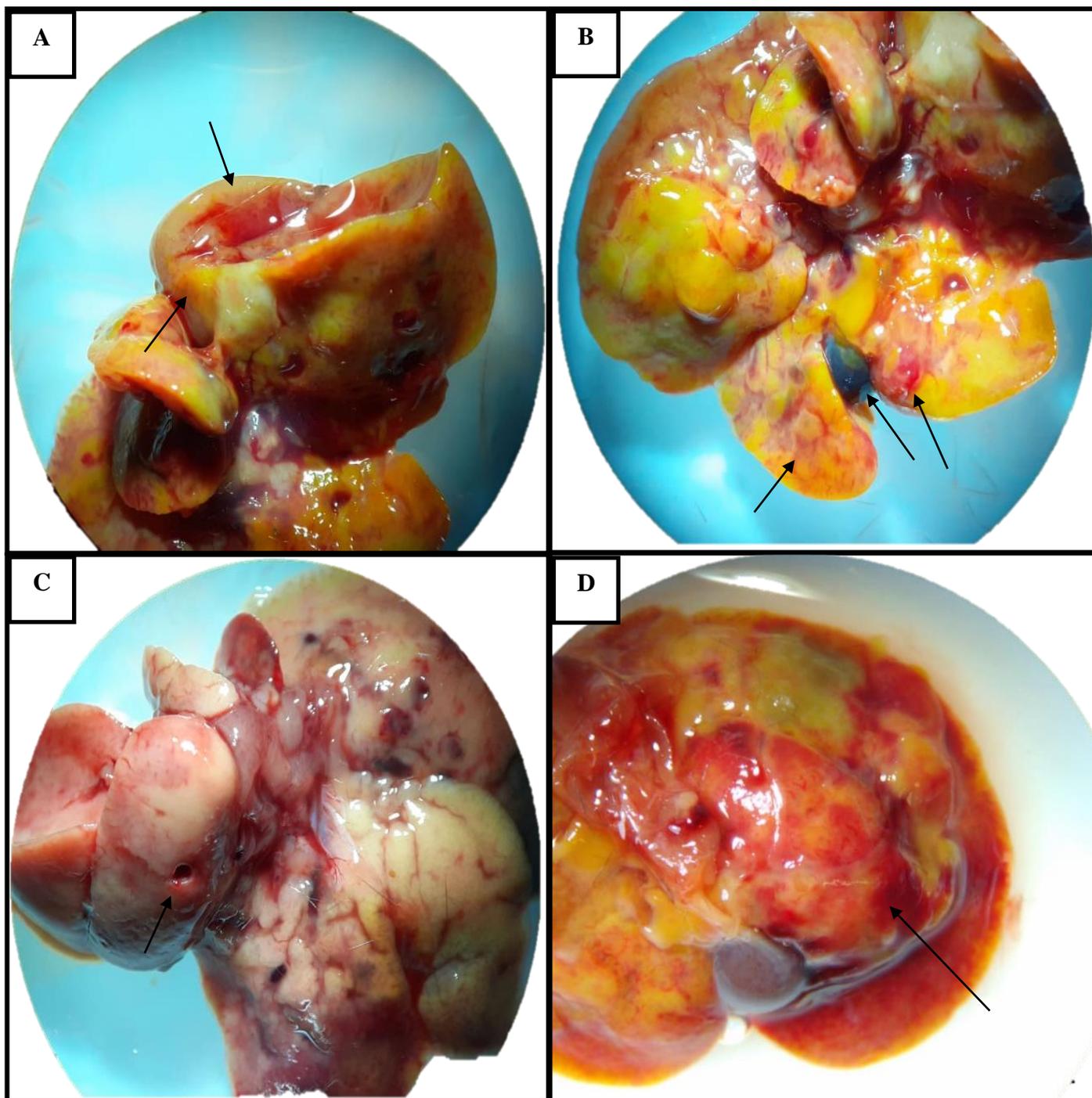


Figura 6: Grupo II - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*, em microscópio estereoscópio aumento de 25x. A: Fígado, lobo caudado; lesão extensa, áreas hemorrágicas e ictericas (seta preta). **B:** Fígado, lobo medial; áreas de lesão extensa, hemorrágicas, ictericas e escurecimento do líquido da vesícula biliar (seta preta). **C:** Fígado, lobo caudal; orifício devido à migração do parasito (seta preta). **D:** Fígado, lobo esquerdo; áreas extensas de hemorragia (seta preta).

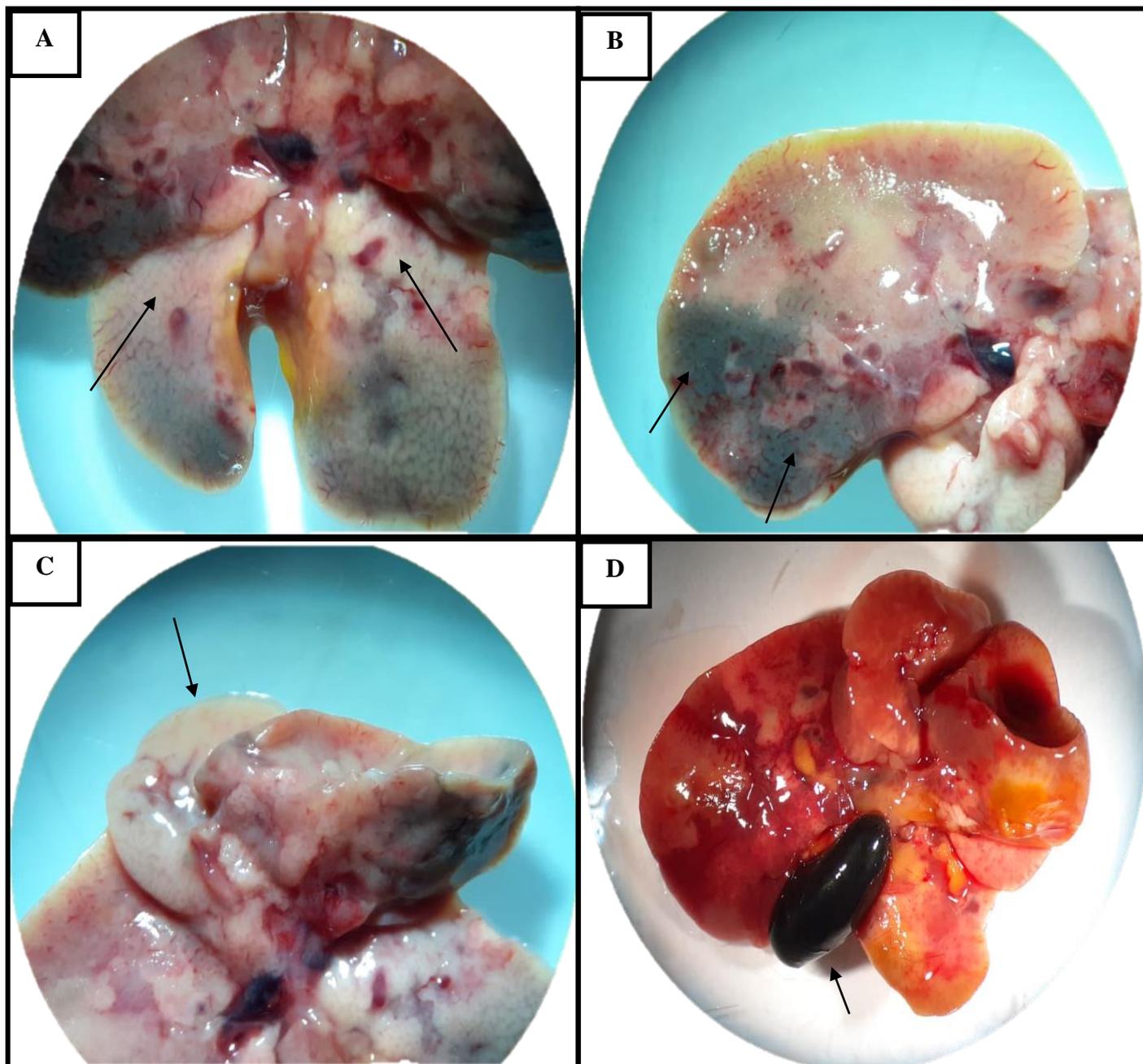


Figura 7: Grupo III - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*, em microscópio estereoscópio aumento de 25x. A: Fígado, lobo medial; lesão extensa esbranquiçada (seta preta). **B:** Fígado, lobo esquerdo; áreas de necrose (seta preta). **C:** Fígado, lobo caudal; área de lesão extensa esbranquiçada (seta preta). **D:** Fígado, lobo medial; vesícula aumentada com líquido escurecido (seta preta).

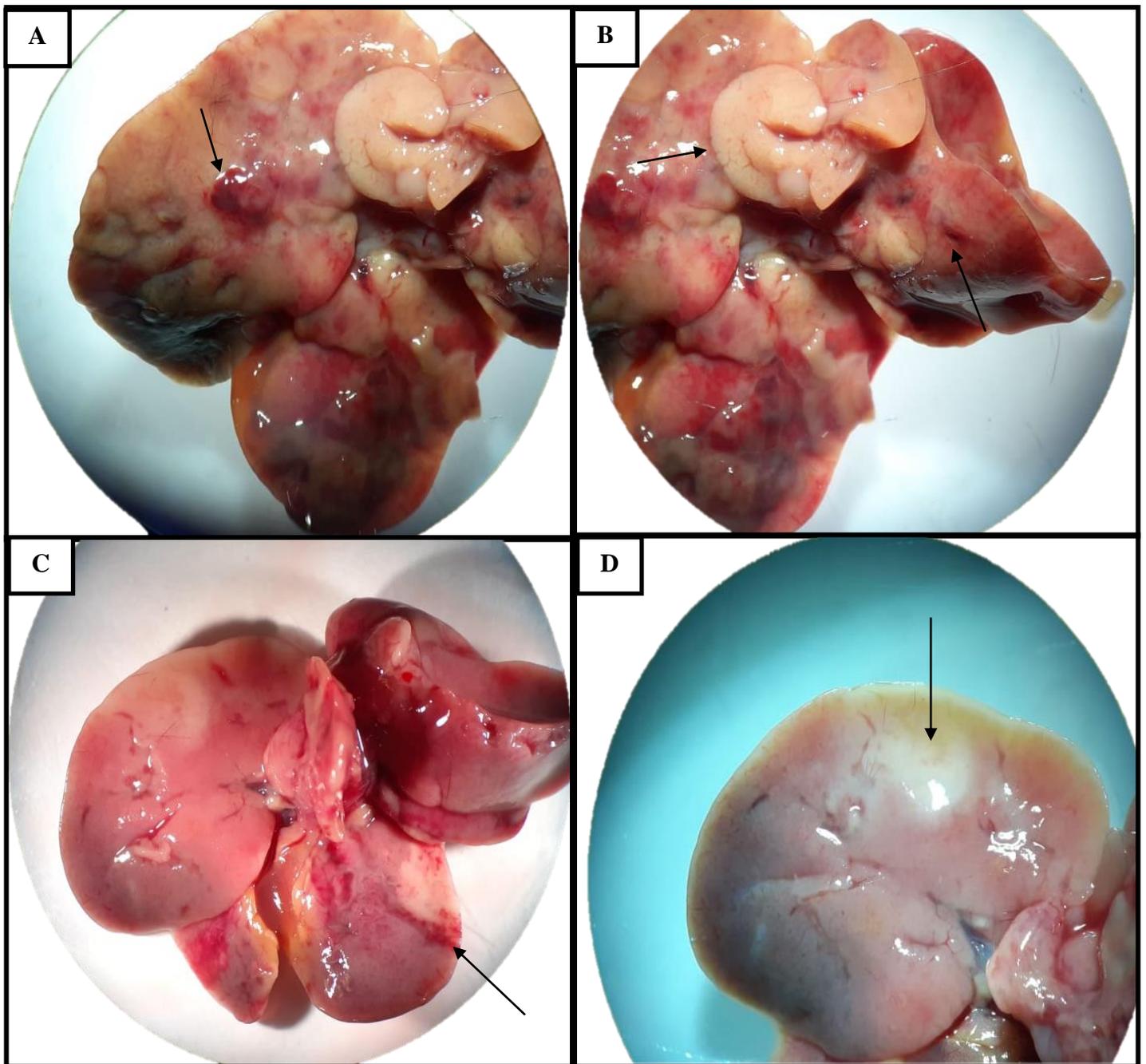


Figura 8: Grupo IV - Macroscopia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*, em microscópio estereoscópio aumento de 25x. A: Fígado, lobo esquerdo; lesão extensa esbranquiçada e áreas hemorrágicas (seta preta). B: Fígado, lobo caudal; lesão focal esbranquiçada e orifício devido à migração do parasito (seta preta). C: Fígado, lobo medial; lesão hemorrágica (seta preta). D: Fígado, lobo esquerdo; lesão focal esbranquiçada (seta preta).

6.5 Histopatologia hepática

A análise microscópica dos cortes histológicos hepáticos dos camundongos de todos os grupos infectados experimentalmente por *F. hepatica*, corados em HE, mostrou lesão em toda extensão dos cortes, apresentando poucas áreas de hepatócitos preservados (**Figuras 9; 12, 13, 15**). Observou-se necrose disseminada, com perda da arquitetura tecidual. Áreas desprovidas de hepatócitos, com infiltrado inflamatório predominantemente de polimorfonucleares neutrófilos e piócitos. Presença de poucos linfócitos e áreas de hemorragia (**Figuras 9-15**).

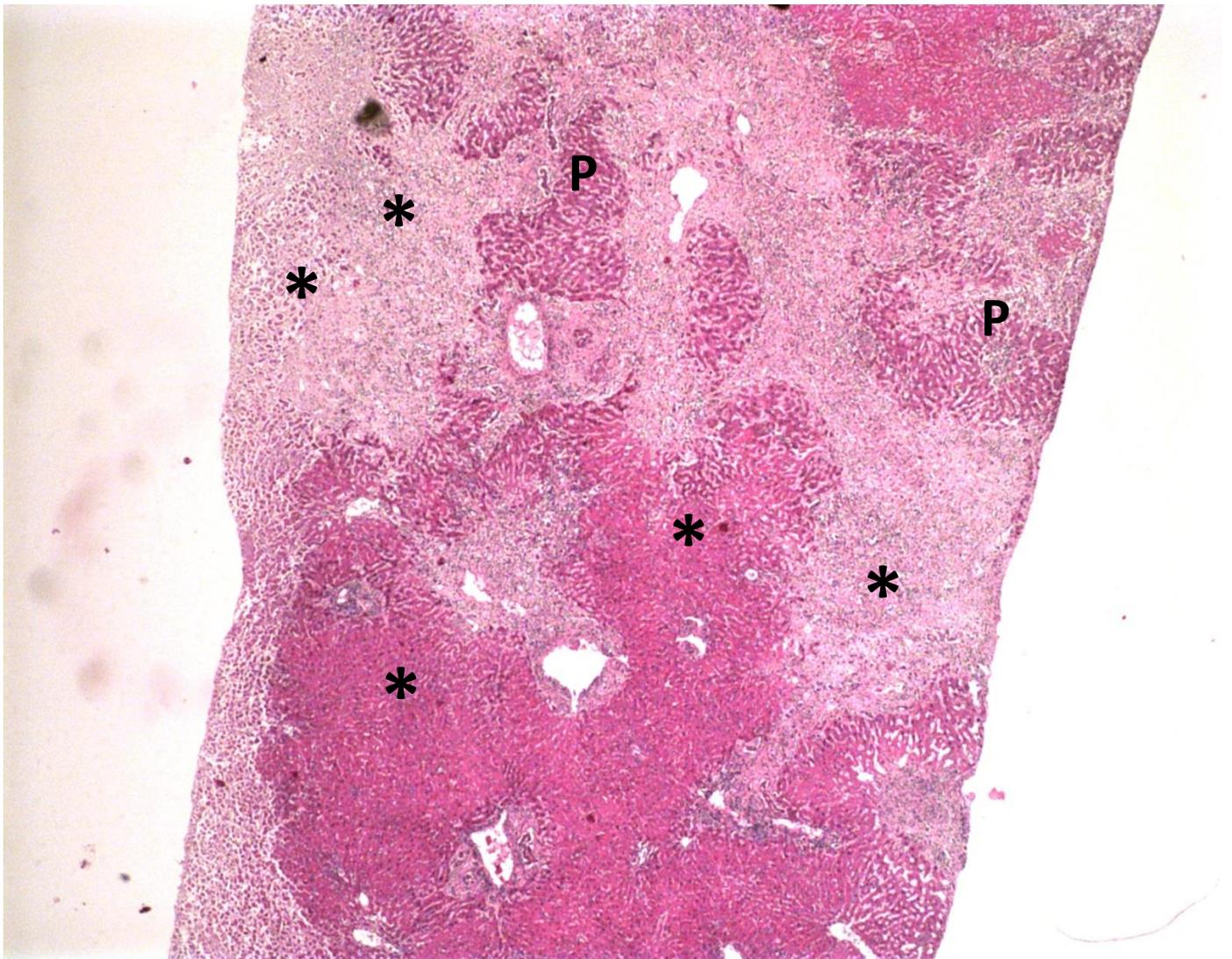


Figura 9: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com H₂O (Grupo IV). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE), aumento 4x. Observa-se pequenas áreas de hepatócitos preservados (P). Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose em diferentes estágios.

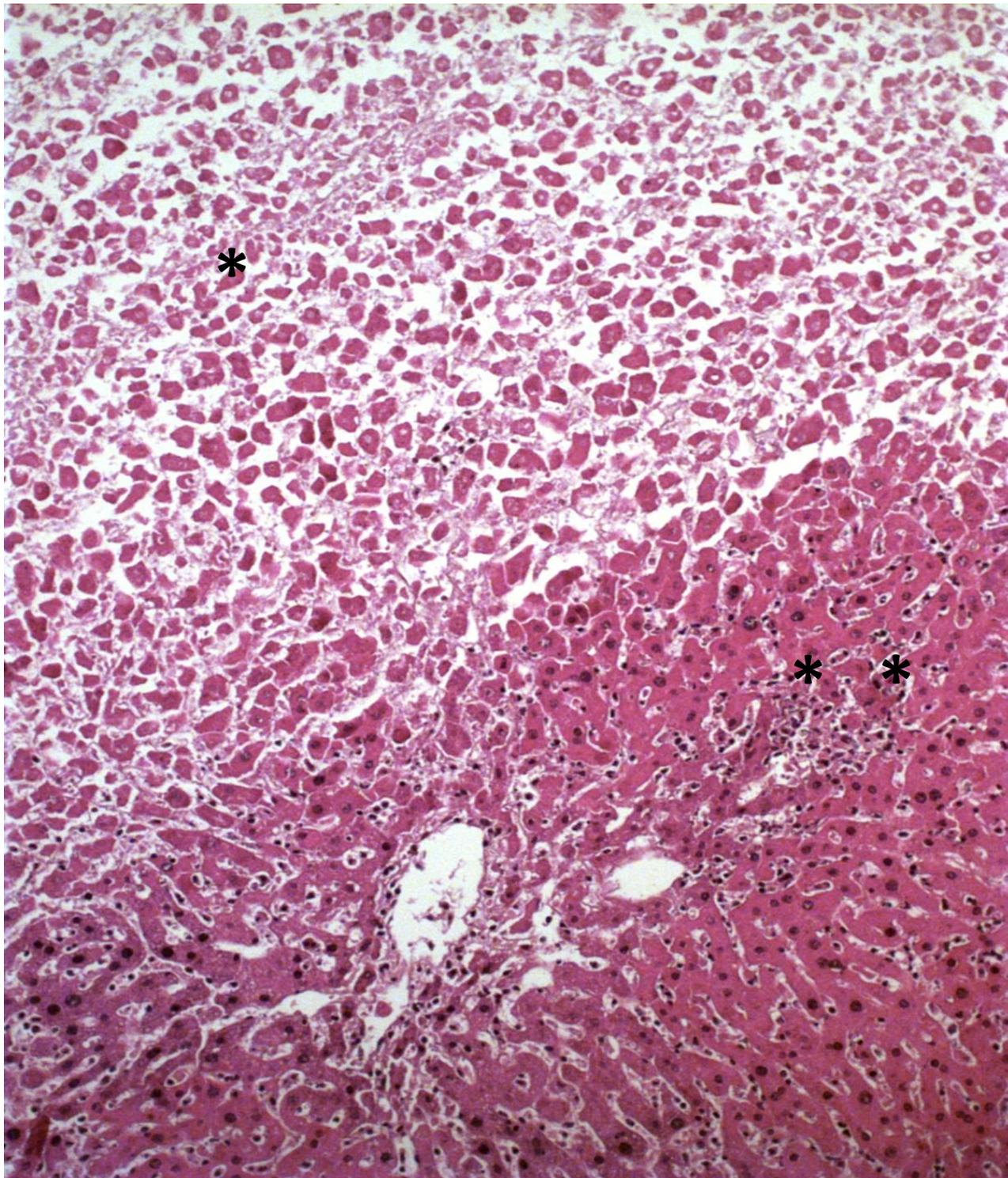


Figura 10: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com H₂O (Grupo IV). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE), aumento 20x. Observa-se áreas de necrose em diferentes estágios, com predomínio de cariólise (*), hepatócitos com núcleos picnóticos (**), e infiltrado inflamatório (seta branca).

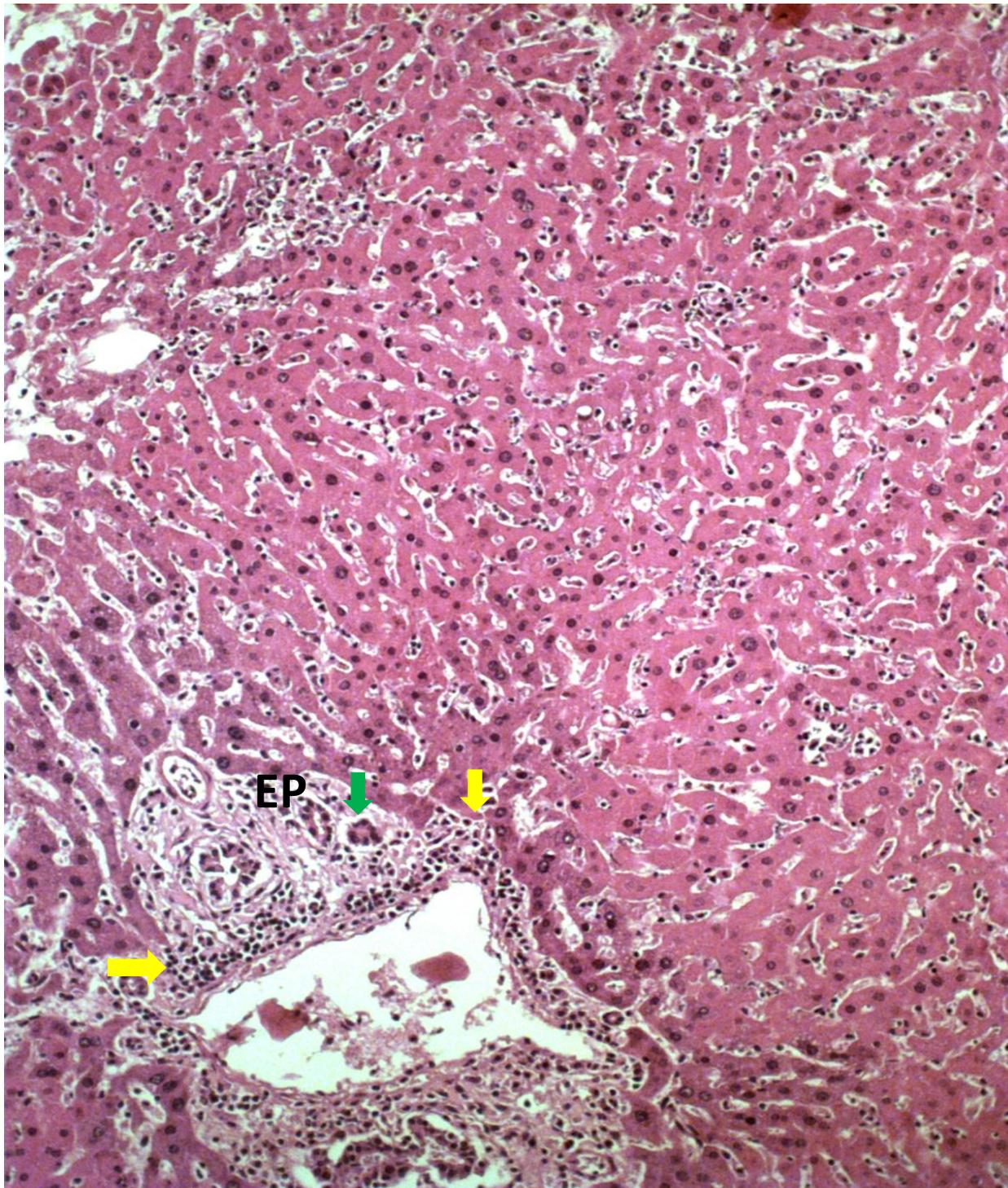


Figura 11: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com H₂O (Grupo IV). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE), aumento 20x. Área de necrose (*); infiltrado inflamatório (seta amarela) no espaço porta (EP); seta verde ducto biliar.

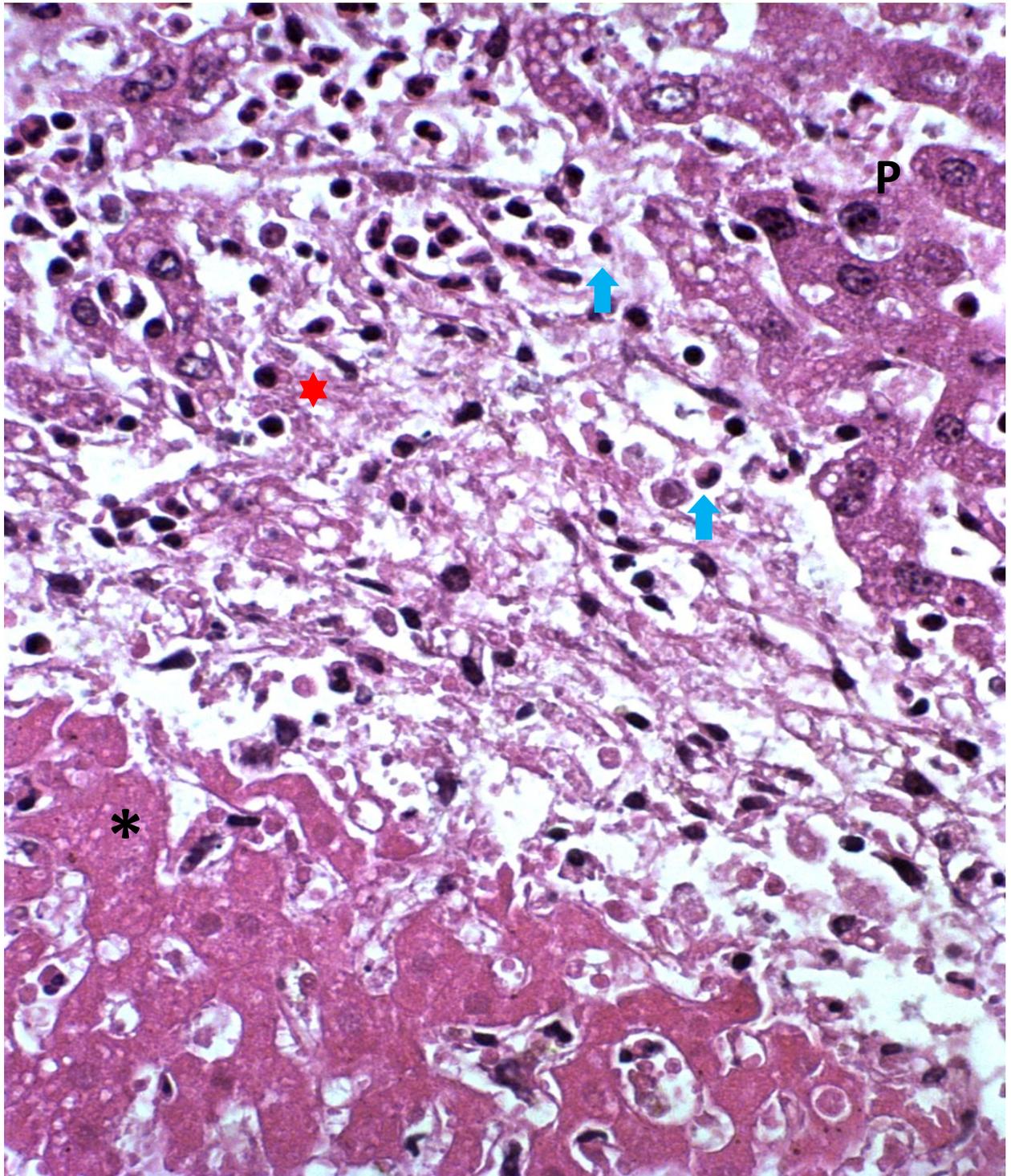


Figura 12: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com H₂O (Grupo IV). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE); aumento 60x. Área de desaparecimento de hepatócitos (*), presença de neutrófilos (seta azul); área de necrose (*); hepatócitos preservados (P).

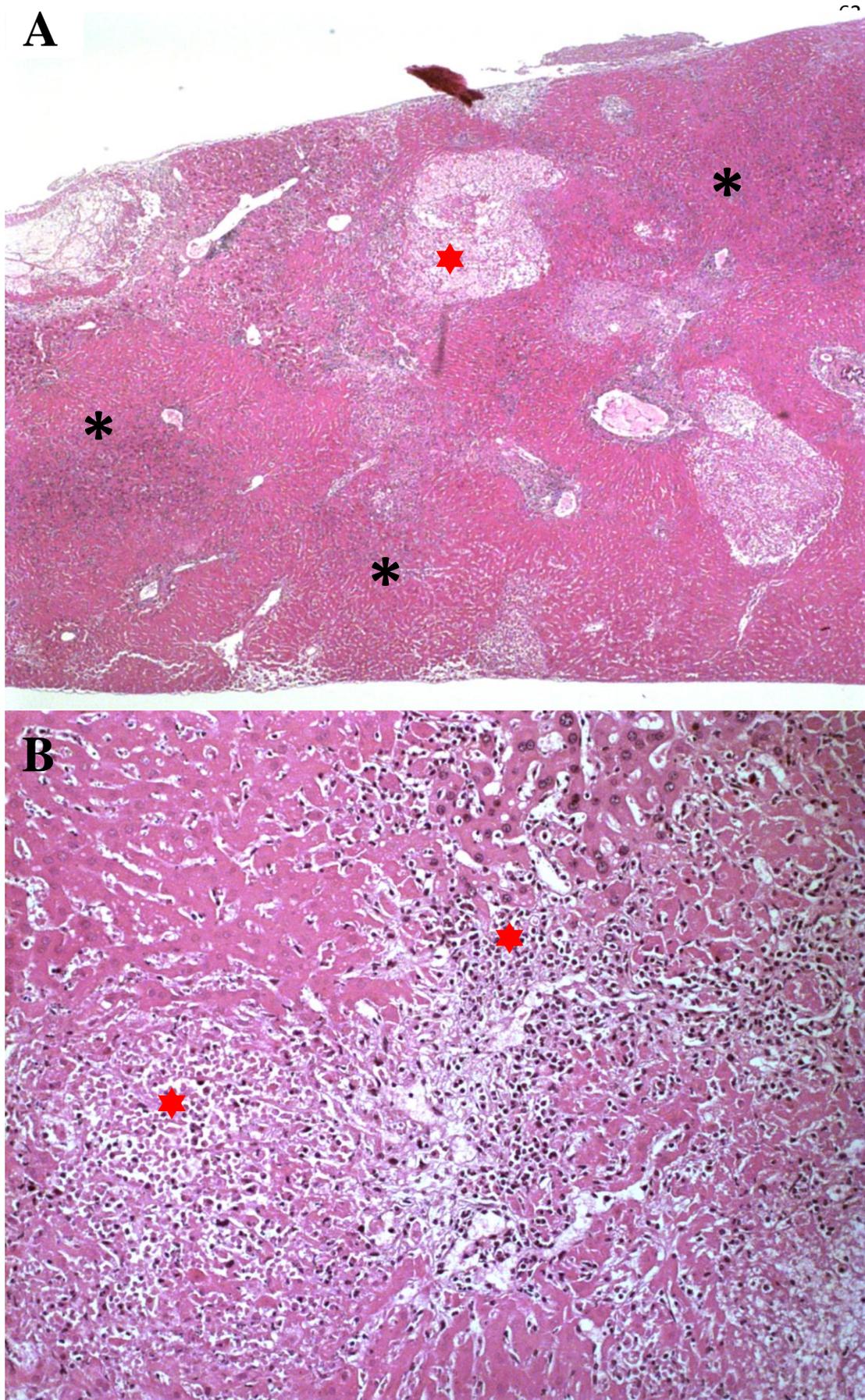


Figura 13: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com NaClO 0,002% (Grupo III). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). A: Aumento 4x B: Aumento de 20x.

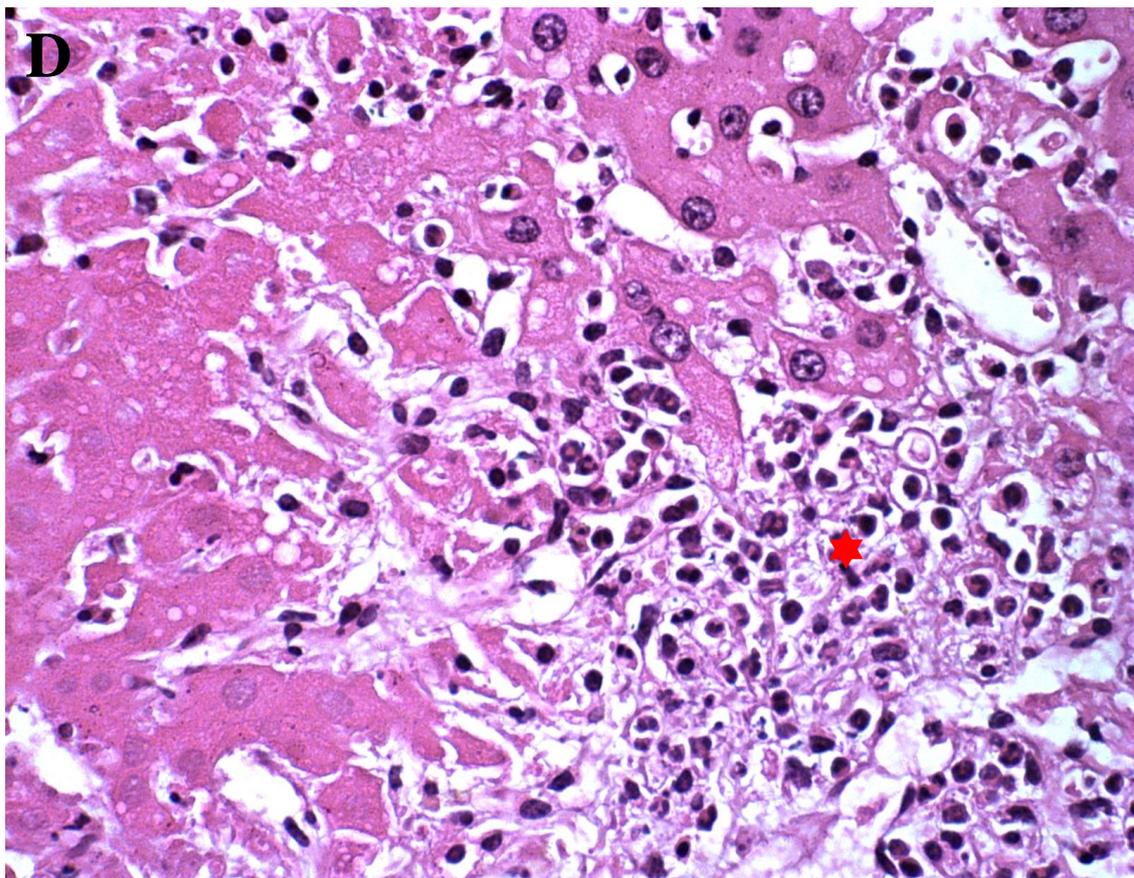
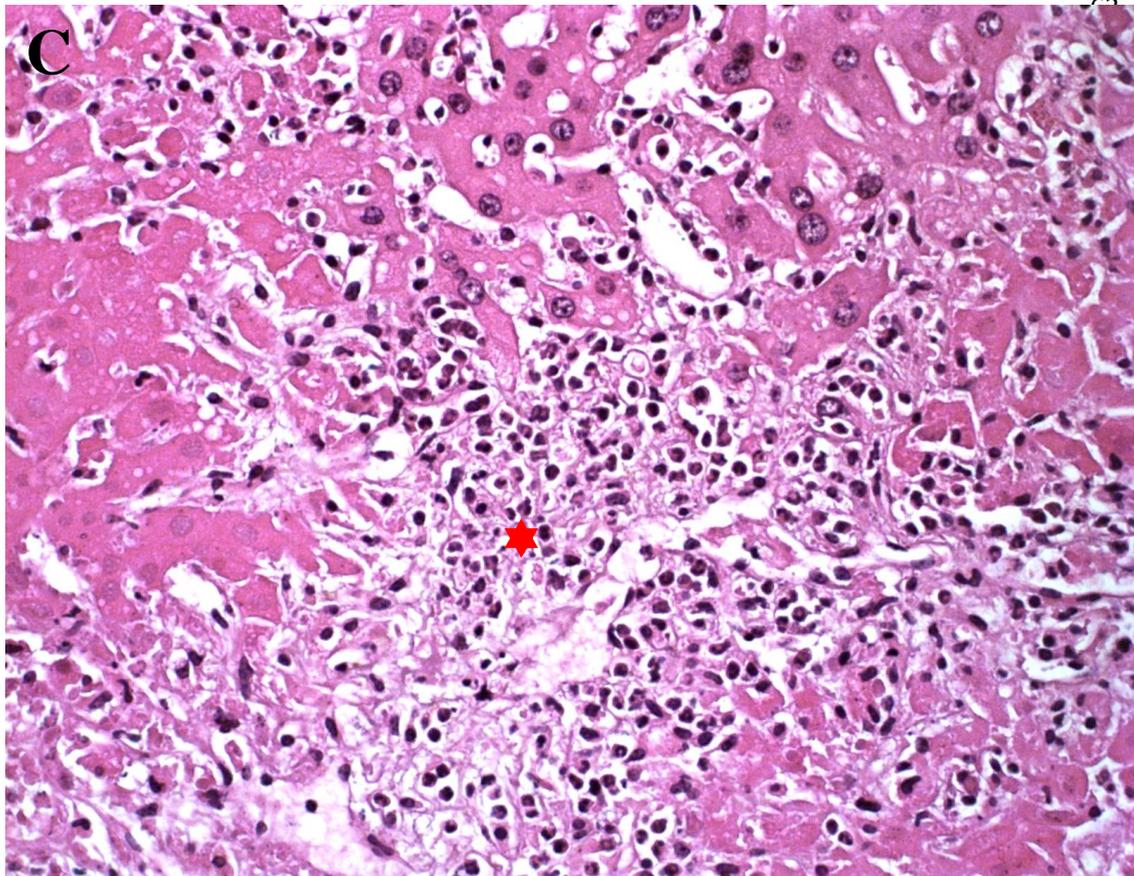


Figura 14: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com NaClO 0,002% (Grupo III). C: Aumento de 40x. D: Aumento de 60x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos; Estrela (★) áreas de desaparecimento de hepatócitos e presença de infiltrado inflamatório; (P) áreas de hepatócitos preservados.

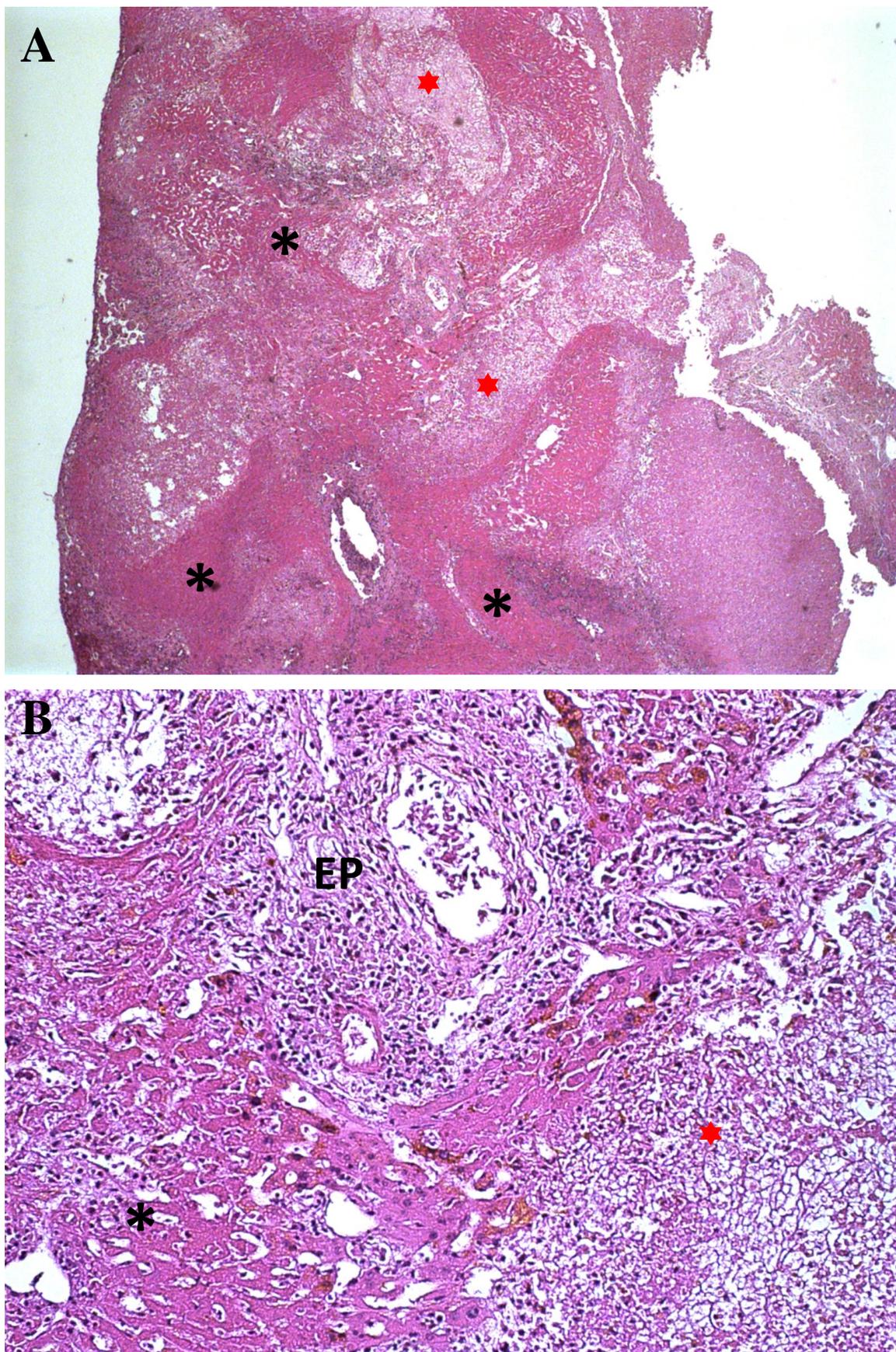


Figura 15: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com NaClO 0,02% (Grupo II). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). **A:** Aumento 4x. **B:** Aumento de 20x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos; Estrela (★) áreas de desaparecimento de hepatócitos e presença de infiltrado inflamatório; (EP) espaço porta.

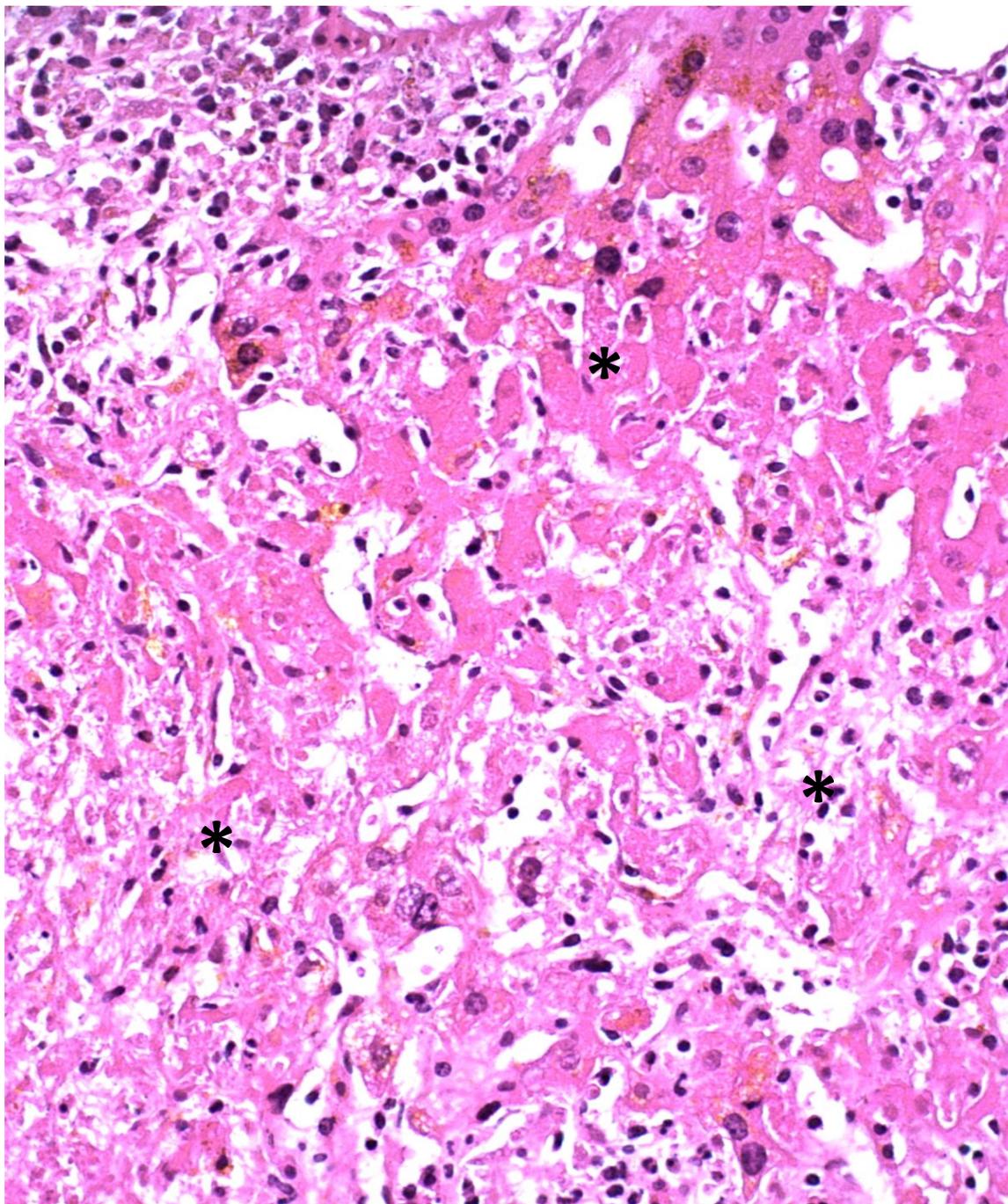


Figura 16: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com NaClO 0,02% (Grupo II). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 40x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos.

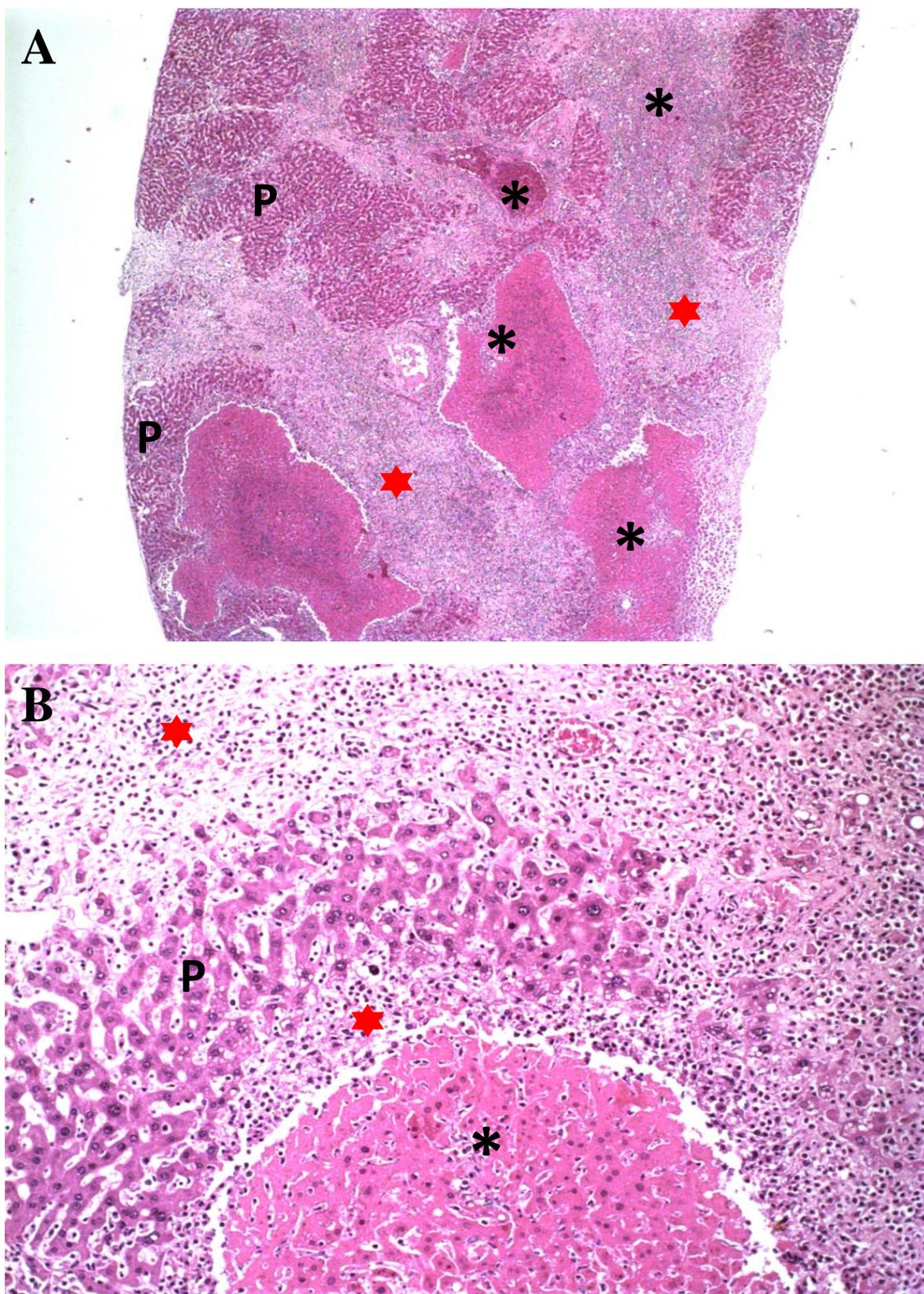


Figura 17: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com NaClO 0,2% (Grupo I). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). A: Aumento 4x. B: Aumento de 20x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos; Estrela (★) áreas de desaparecimento de hepatócitos e presença de infiltrado inflamatório; (P) hepatócitos preservados.

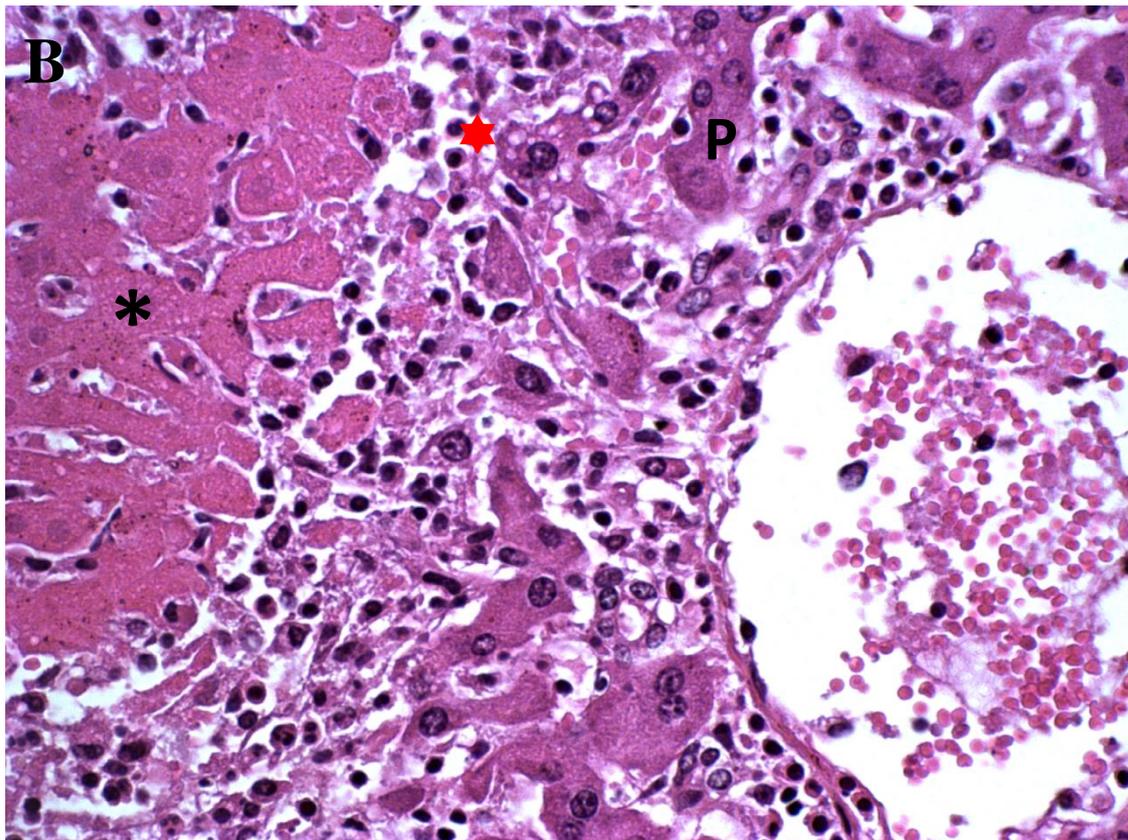
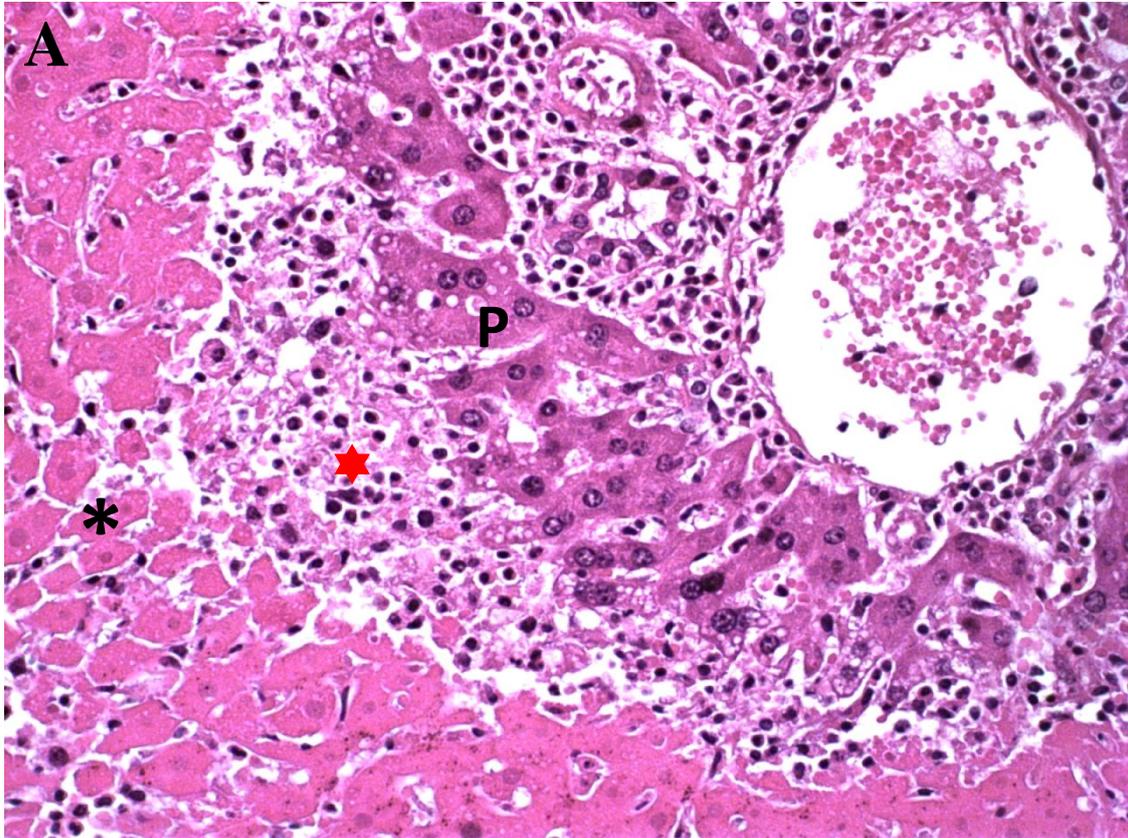


Figura 18: Microfotografia de fígado de camundongo infectado com metacercárias de *Fasciola hepatica* tratada com NaClO 0,2% (Grupo I). C: Aumento de 40x. D: Aumento de 60x. Os asteriscos (*) indicam áreas de necrose de hepatócitos; Estrela (★) áreas de desaparecimento de hepatócitos e presença de infiltrado inflamatório; (P) hepatócitos preservados.

6.6 Parasitos recuperados do fígado de camundongos infectados por *Fasciola hepatica*

Durante a maioria das necropsias, na 4ª spi, recuperou-se pelo menos um parasito jovem do fígado de todos os grupos dos camundongos infectados. Os parasitos foram lavados em solução salina, fixados entre lâminas com formol 10% e corados pela técnica de Carmim de *Semichon* (CABLE, 1969). Os espécimes de todos os grupos possuíam o corpo foliáceo, achatado dorsoventralmente, com o cone cefálico bem evidente localizado na porção anterior do corpo do parasito. A ventosa oral, arredondada, localizada no ápice do cone, seguida por faringe e esôfago musculosos. O esôfago bifurca-se em dois cecos intestinais bastante ramificados, dos quais surgem ramificações secundárias. Os cecos intestinais se estendem até a porção final do corpo do parasito. A ventosa ventral localiza-se na região mediana do corpo e seu tamanho era maior do que a ventosa oral. Os parasitos jovens não possuem sistema reprodutor desenvolvido, não sendo possível observar as estruturas do sistema reprodutor feminino e masculino na imagem (**Figura 19**).

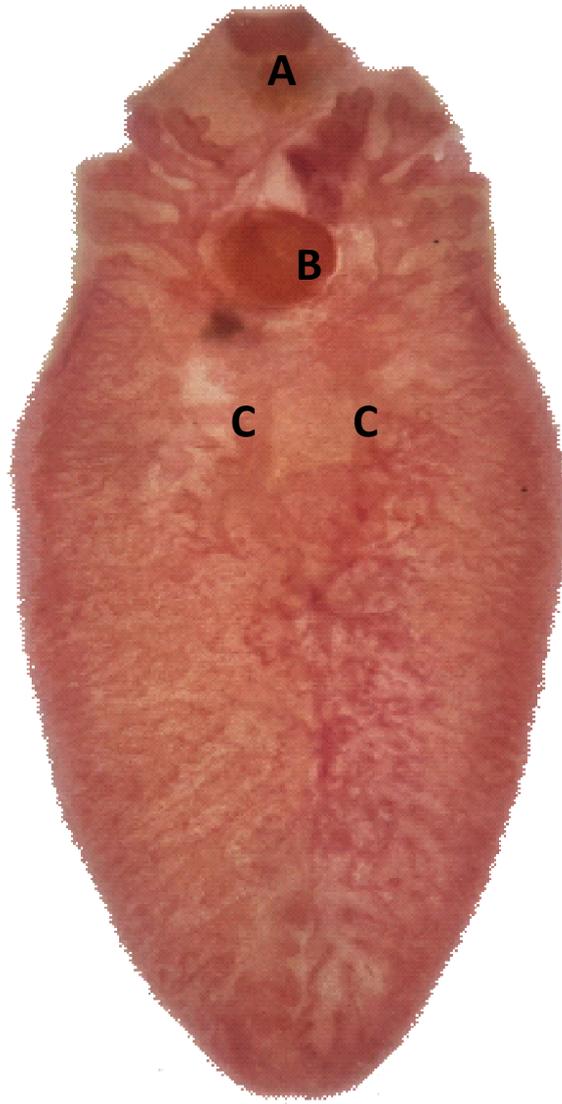


Figura 19: *Fasciola hepatica* – Parasito jovem (4 mm de comprimento x 3 mm de largura), recuperado ao 22° dpi do fígado de um camundongo C57BL/6J do grupo II, experimentalmente infectado por *Fasciola hepatica*, em microscópio estereoscópio aumento de 25x. Sistema digestório; a. Ventosa oral. b. Ventosa ventral ou acetábulo. c. cecos intestinais.

7 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstram que metacercárias tratadas com NaClO nas concentrações 0,2%, 0,02% e 0,002% continuaram viáveis e com capacidade de infectar os camundongos da linhagem C57BL/6J, visto que, desenvolveram a infecção semelhante ao observado para o grupo IV (H₂O + metacercárias sem tratamento prévio com NaClO). Embora o hipoclorito de sódio seja utilizado no controle de microrganismos como descrito pela ANVISA (1976) na proporção de 20 mL do produto diluído em 1000 mL de água para desinfecção de hortifrutigranjeiros, não foi observado à ação sobre metacercárias de *F. hepatica*, mesmo quando utilizou-se o NaClO em doses 10x maiores que o recomendado.

O hipoclorito de sódio tem capacidade de neutralizar aminoácidos interferindo no metabolismo celular de microrganismos, nesse trabalho não foi observado ação suficiente sobre as camadas de mucopolissacarídeos das metacercárias de *F. hepatica*. Provavelmente o hipoclorito de sódio não foi capaz de destruir as duas paredes das metacercárias, a parede externa do cisto formada por duas camadas, camada I e II, compostas por grânulos de proteínas/carboidratos e a parede interna do cisto formada, por outras duas camadas, camada III também composta de proteínas/carboidratos e camada IV composta de queratina. Tal fato foi confirmado pela microscopia eletrônica de varredura quando se observou que as metacercárias apresentavam integridade da parede externa como descrito por Dixon (1964 a e b).

Vários trabalhos de sanitização de superfícies de produtos hortifrutigranjeiros, destinadas ao processamento mínimo têm sido realizados com compostos clorados, visando melhoria da qualidade e segurança dos alimentos, como Ukuku e Fett (2002), que avaliaram a eficácia de hipoclorito de sódio (1.000 mg/L/2min com pH 6,5) e peróxido de hidrogênio (5% por dois minutos) em melões cantaloupes inoculados com *Listeria monocytogenes* (108 UFC/mL) por 0, 1, 3, 6, 9 e 15 dias a 4°C. Os resultados demonstraram que nos dois tratamentos por 24 horas, houve redução na população do microorganismo abaixo do nível de detecção (2UFC/cm²). Com cinco e 15 dias de inoculação, a população de *L. monocytogenes* continuou em níveis abaixo do nível de detecção (2 UFC/cm²). Entretanto, Ukuku et al., (2004) relataram a inabilidade de hipoclorito de sódio e do peróxido de hidrogênio na redução de *Salmonella stanley* e de

Escherichia coli na superfície de melões cantaloupes após três ou mais dias de estocagem a 4°C.

Nesse estudo confirmou-se a capacidade de infectividade e viabilidade das metacercárias de *F. hepatica*, uma vez que, foram realizados testes “*in vivo*”, diferente de trabalhos que testam a ação de algumas substâncias químicas em metacercárias de *Fasciola spp.* tratadas apenas “*in vitro*”, utilizando azul de toluidina a 0,1% para evidenciar a viabilidade do parasito. Em um estudo realizado por El-Sayad et al., (1997), metacercárias tratadas com permanganato de potássio por 10 minutos na concentração de 24mg/L, foram examinadas em microscópio óptico após teste, utilizando azul de toluidina a 0,1%, onde metacercárias que apresentavam um formato típico de gânglios excretorios foram consideradas viáveis e quando mortas apresentavam uma massa escura de estrutura atípica.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a infecção experimental de camundongos C57BL/6J com 10 metacercárias de *F. hepatica* tratadas com NaClO nas concentrações 0,2%, 0,02% e 0,002%, resultaram em uma taxa de mortalidade elevada entre a 3ª e 4ª semana após a infecção. Foi demonstrado, também, que os sinais clínicos da doença observados em alguns camundongos C57BL/6J infectados coincidem com os sinais clínicos apresentados por outros como hospedeiros bovinos e ovinos, sendo: prostração, dificuldade de locomoção e morte na fase aguda da doença (BORAY, 1967; ROJO-VÁZQUEZ et al., 2012), provavelmente devido comprometimento hepático durante a fase de migração dos parasitos jovens.

A patologia de *F. hepatica* está associada ao número de metacercárias ingeridas, a carga parasitária resultante e as fases de migração dos parasitos jovens nos parênquimas hepáticos, dos parasitos adultos nos ductos biliares e a resposta dos hospedeiros. As alterações patológicas macroscópicas observadas foram similares às encontradas por Thorpe (1965). Foram observadas lesões no fígado caracterizadas com aumento de volume, áreas de hemorragia, necrose e fibrose do parênquima hepático. A avaliação macroscópica dos fígados dos animais infectados que tiveram morte súbita na 4ª semana permitiu observar lesões focais subcapsulares, principalmente nos lobos esquerdo e medial, lesões difusas e disseminadas, respectivamente, com alteração na arquitetura anatômica do órgão. Esta alteração e as lesões hepáticas relatadas nos resultados, além da presença de hemorragia na cavidade abdominal aos 20º dpi, devem-se provavelmente ao processo migração das formas jovens de *F. hepatica*, relacionado aos produtos excreto-secretados pelos parasitos, que rompem a parede intestinal,

alcançam o fígado e migram no parênquima hepático dos camundongos. Durante essa fase de migração, há destruição de vilosidades, da camada muscular intestinal, destruição de hepatócitos e pode ocorrer rompimento de vasos, tanto no intestino quanto no fígado dos animais, estando de acordo com o que foi observado por Dawes (1963 a e b).

Diniz (2017) demonstrou em seu estudo a infecção experimental de camundongos C57BL/6J com três metacercárias de *F. hepatica*. Os resultados de seu trabalho evidenciaram uma taxa inferior de mortalidade dos hospedeiros em relação aos trabalhos em que a infecção dos animais se deu com doses mais altas de metacercárias do parasito, como 10, 15 e superior a 20 metacercárias, apresentando 100% de mortalidade entre a 3ª e 4ª semana após a infecção (DAWES, 1963a; O'NEILL et al., 2000; DE PAULA, 2010). Entretanto, observou-se que a infecção com três metacercárias é suficiente para o desenvolvimento da infecção, permitindo avaliação clínica dos animais e análise patológica, assim como nesse estudo, quando se infectou camundongos da linhagem C57BL/6J com 10 metacercárias tratadas com NaClO. Diniz (2017), também demonstrou, que os sinais clínicos da doença observados em alguns camundongos C57BL/6J infectados coincidem com os sinais clínicos apresentados por hospedeiros naturais do parasito (BORAY, 1967; ROJO-VÁZQUEZ et al., 2012), provavelmente devido à inflamação e principalmente, comprometimento hepático durante a fase de migração dos parasitos jovens, assim como observado nesse estudo na 4ª spi.

Alguns desses achados macroscópicos observados nos camundongos C57BL/6J infectados também estão presentes em ovinos e bovinos com fasciolose crônica, segundo Rushton e Murray (1977), Bostelmann et al., (2000) e Foreyt (2005), que descrevem a condenação de fígados de gado com lesões hepáticas, hepatomegalia, lóbulos com bordas abauladas, pontos hemorrágicos distribuídos difusamente pelo parênquima, focos de deposição de fibrina na superfície do parênquima e focos de necrose, observados tanto em ovinos como bovinos.

Quanto à histologia hepática, na maioria das espécies, o fígado apresenta-se revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, conhecida como cápsula hepática, e os hepatócitos estão dispostos nos lóbulos do fígado, que consistem em estruturas poligonais com vários espaços porta na periferia e uma veia central. Os cordões de hepatócitos parecem irradiar para fora da artéria central. As irrigações sanguíneas e biliares se dão em direções opostas, o sangue arterial e venoso misto se move das regiões portal para a veia central por meio de sinusóides, enquanto que a bile, secretada

em ductos biliares, é direcionada por esses canalículos para regiões portais até a vesícula biliar. Os cordões de hepáticos são compostos de colunas de hepatócitos que se estendem da região portal para a veia central. Os espaços entre os cordões, vistos como regiões brancas, contêm os sinusoides do fígado (ROGERS e DINTZIS, 2012). Através da histopatologia hepática dos camundongos C57BL/6J experimentalmente infectados com metacercárias de *F. hepatica* tratadas com NaClO nas concentrações 0,2%; 0,02%; 0,002%, assim como, as metacercárias incubadas somente com água desclorada, que foram a óbito na 4ª spi, observou-se alterações com infiltrado inflamatório, destruição de hepatócitos, extensas áreas de necrose, lesões difusas e disseminadas. Nos estudos de Dawes (1963 a e c), realizados com análises de cortes corados em HE, alguns desses achados, no tecido hepático, também foram observados, sugerindo que parasitos jovens migraram pelo parênquima hepático.

O presente trabalho nos permitiu observar que a infecção de camundongos C57BL/6J com 10 metacercárias de *F. hepatica* tratadas com NaClO nas concentrações de 0,2%, 0,02% e 0,002% é capaz de desenvolver o quadro clínico, com alterações macroscópicas e microscópicas da doença. Assim, os resultados encontrados mostram que são necessários mais estudos com sanitizantes a fim de encontrar produtos adequados e eficientes para inativar as metacercárias de *F. hepatica*, uma vez que, há expansão desse parasito em todas as regiões brasileiras. Portanto, as hortaliças comercializadas em feiras livres, sacolões, supermercados e restaurantes estão cada vez mais propícias a presença de metacercárias de *F. hepatica*, o que leva a preocupação da ocorrência de fasciolose humana.

8 CONCLUSÕES

- O hipoclorito de sódio não inativa as metacercárias de *Fasciola hepatica* nas concentrações de 0,2%, 0,02% e 0,002%.
- Metacercárias de *Fasciola hepatica* tratadas com hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,2%, 0,02% e 0,002% são capazes de infectar camundongos da linhagem C57BL/6J.
- Hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,2%, 0,02% e 0,002% não altera estrutura das camadas de mucopolissacarídeos das metacercárias de *Fasciola hepatica* observadas por meio da MEV.
- Esses resultados devem ser divulgados para a população, produtores, manipuladores de verduras “*in natura*”, bem como os órgãos competentes, para que todos conheçam a ineficácia do hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,2%, 0,02% e 0,002% sobre metacercárias de *Fasciola hepatica*.

9 REFERÊNCIAS

- AKSOY DY, KERIMOGLU U, OTO A, ERGUVEN S, ARSLAN S, UNAL S, BATMAN F, BAYRAKTAR Y 2005. Infection With *Fasciola hepatica*. **Clin Microbiol Infect**: v. 11, n. 11, p. 859-86.
- AMARAL ADF, BUSETTIET 1979. Fasciolose hepática humana no Brasil. **Rev Inst Med trop S. Paulo** 21: 141-145.
- AMATO NV, SILVA LJ 1987. Infecção humana por *Fasciola hepatica*. Relato de um caso e análise da questão. **Rev Inst Med trop S. Paulo**: 19: 275-277.
- ANDREWS SJ 1999. The Life Cycle of *F. hepatica*. 3rd Edition, **CABI Publishing Wallingford**: 1-30.
- APT W, AGUILERA X, VEJA AH, ZULANTAY I, APT P, GONZÁLEZ V, RETAMAL C, RODRÍGUEZ J, SANDOVAL JP 1993. Prevalencia de Fascioliasis en Humanos, Caballos, Cerdos y Conejos Silvestres, en Tres Provincias de Chile. **Boletín de la oficina sanitaria pan-americana**: v. 115, n.5.
- AQUINO FDM, SOARES VE, ROSSI GAM, NICARETTA JE, BASTOS TDSA, CRUVINEL LB, COUTO LFM, CAVALCANTE ASDA, FELIPPELLI G, CRUZ BC, MACIEL WG, GOMES LVC, LOPES WDZ 2018. Prevalence of bovine fascioliasis, areas at risk and ensuing losses in the state of Goiás, **Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**: 27(2), 123-130.
- ASHRAFI K, VALERO MA, FORGHAN-PARAST K, REZAEIAN M, SHAHTAHERI SJ, HADIANI MR, BARGUES MD, MAS-COMA S 2006b. Potential transmission of human fascioliasis through traditional local foods, in northern Iran. **Iranian Journal of Public Health**: 35, 57–63.
- ASHRAFI K, VALERO MA, MASSOUD J, SOBHANI AR, SOLAYMANI-MOHAMMADI S, CONDE P, KHOUBBANE M, BAGUES MD, MAS-COMA S 2006a. Plant-borne human contamination by fascioliasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**: 75, 295–302.
- BARANSKY MC, AMARAL ADF, CARNEIRO FILHO M, SILVA RF, SILVEIRA HB, CUNHA LAM, MAGNI NR 1977. Novos casos autóctones de fasciolose hepática humana em Curitiba (Estado do Paraná-Brasil). **An Fac Med Paraná**: 20: 7-25.
- BARUCH WA 1999. Fasciolíase. In: Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. Atheneu: 222-227.
- BEHM CA, SANGSTERS NC 1999. Pathology, Pathophysiology And Clinical Aspects. In: Fasciolosis. 1ª edição. **CAB International**: p.188-224.
- BENNEMA SC, SCHOLTE RGC, MOLENTO MB, MEDEIROS C, CARVALHO OS 2014. *Fasciola hepatica* in Bovines in Brazil: Data Availability and Spatial Distribution. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**: 56(1): 35-41.

BERNARDO CC, CARNEIRO MB, AVELARA BR, DONATELE DM, MARTINS IVF, PEREIRA MJS 2011. Prevalence of Liver Condemnation Due to Bovine Fasciolosis in Southern Espírito Santo: Temporal Distribution and Economic Losses. **Rev Bras Parasitol Vet:** 20(1): 49-53.

BJORLAND J, BRYAN RT, STRAUSS W, HILLEYR GV, MCAULEY JB 1995. Surto de Fasciolíase aguda entre índios aimarás no altiplano boliviano. **Clin Infect Dis:** Novembro 21 (5): 1228-33.

BORAY JC 1969. Experimental Fascioliasis in Australia. **Adv Parasitol:** v. 7, p. 95-210

BORAY JC, ENIGK K 1964. Laboratory studies on the survival and infectivity of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* metacercariae. **Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie:** 15, 324–331.

BOSTELMANN SCW, LUZ E, SOCCOL VT, CIRIO SM 2000. Hepatopathology of infection by *Fasciola hepatica* in cattle, buffaloes and sheep. **Archives of Veterinary Science:** v.5, p.95-100.

BRASIL 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 158 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1718-2. 1. Intoxicação alimentar. 2. Alimentos. 3. Vigilância epidemiológica. I. Título. II. Série. CDU 613.2.099.

BRAVO TC 2007. *Fasciola hepatica*: ciclo biológico y potencial biótico. **Rev Mex Patol Clin:** v.54, n. 1, p. 21-27.

BRENNAN GP, FAIRWEATHER I, TRUDGETT A, HOEY E, MCCOY M, MCCONVILLE M, MEANEY M, ROBINSON M, MCFERRAN N, RYAN L, LANUSSE C, MOTTIER L, ALVAREZ L, SOLANA H, VIRKEL G, BROPHY PM 2007. Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology:* v.82, n.2, p.104-109.

CARPIO N, IWASHITA IST 2008. Prevalencia de infección humana por *Fasciola hepatica* en pobladores del distrito de Caujul provincia de Oyon, región de Lima, Perú. **Acta méd. peruana:** v. 25, n. 2, p. 77-80.

CARVALHO JCM 1940. Contribuição para o conhecimento da fauna helmintológica de Minas Gerais. **Ceres (Viçosa):** v.5, p.411-23.

CHARLIER J, DUCHATEAU L, CLAEREBOUT E, WILLIAMS D, VERCRUYSSSE J 2007. **Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds.**

COELHO L, LIMA W, GUIMARÃES M 2009. Combinações simpátricas e alopátricas de *Lymnaea columella* e *Fasciola hepatica* do sul e sudeste do Brasil. **Journal of Helminthology**: v.83 (3), p. 285-288.

COELHO LHL 2007. *Lymnaea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae): dinâmica de populações em Itajubá, Minas Gerais, e suscetibilidade à infecção por *Fasciola hepatica*. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

COELHO LHL, LIMA WS 2003. Dinâmica populacional de *Lymnaea columella* e sua infecção natural por *Fasciola hepatica* no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Journal of Helminthology**: v. 77, n. 1, p. 7-10.

CORAL RP, MASTALIR ET, MASTALIR FP 2007. Retirada de *Fasciola hepatica* da via biliar principal por coledoscopia. **Rev Col Bras Cir**: v.34,p.70-1.

CORDOVA M, NOPO H, BELLATIN J, NAQUIRA C, GUERRA H, ESPINOSA JR 1997. *Fasciola hepatica* cysteine proteinaes: immunodominant antigens in human fasciolosis. **Am J Trop Med Hyg**: 57: 660-666.

CORREA MOA, FLEURY GC 1971. Fasciolose hepatica humana: novo caso autóctone. **Rev Soc bras Med trop**: 5: 267-270.

COSTA AMCB 2010. **Fasciolose Bovina: Aspectos clínicos e epidemiológicos no Alentejo**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa/PT.

CRUZ SMSL 2013. **Pilot study on Bovine Fasciolosis in Praia slaughterhouse in Santiago – Cape VerdeEQT**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Orientador: Professora Doutora Maria Madalena Vieira-Pinto. Vila Real.

DACAL ARC, COSTA HMA, LEITE ACR 1988. Susceptibilidade de *Lymnaea (pseudosuccinea) columella* (Say, 1817) exposta à infecção por miracídios de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**: 30(5), 361-369.

DAWES B 1962. On the Growth and Maturation of *Fasciola hepatica* L. in the Mouse. **J Helminth**: n.36, p.11-38.

DAWES B 1963a. Hyperplasia of the Duct Biliar in Fasciolosis and Its Relation to the Problem of Nutrition in the Liver-Fluke, *Fasciola hepatica* L. **Parasitol**: v. 53, p. 123-133.

DAWES B 1963b. The Migration of Juvenile Forms of *Fasciola hepatica* L. Through the Wall of the Intestines in the Mouse, With Some Observations on Food and Feeding. **Parasitol**: v. 53, p. 109- 122.

DAWES B 1963c. Some Observations of *Fasciola hepatica* L. During Feeding Operations in the Hepatic Parenchyma of the Mouse, With Notes on the Nature of Liver Damage in This Host. **Parasitol**: v. 53, p. 135-43.

DIXON KE 1964a. Excystment of metacercarie of *Fasciola hepatica* L. *in vitro*. **Nature, Lond**: 202, 1240-1241.

DIXON KE 1964b. The relative suitability of sheep and cattle as hosts for the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. **J. Helminth**: 38, 203-212.

DIXON KE 1965. The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. **Parasitology**: 55, 215-226.

DIXON KE, MERCER EH 1967. A formação da parede do cisto da metacercária de *Fasciola hepatica* L. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**: 77 (3): 345-360.

DORNY P, PRAET N, DECKERS N, GABRIEL S 2009. Emerging food-borne parasites. **Vet Parasitol**: 163: 196-206.

DRACZ RM, LIMA WDS 2014. Autochthonous Infection of Buffaloes and Cattle by *Fasciola hepatica* in Minas Gerais, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**: 23(3): 413-6.

DRACZ RM, RIBEIRO VMA, PEREIRA CAJ, LIMA WDS 2016. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Linnaeus, 1766) in Minas Gerais, Brazil. **Braz J Vet Parasitol Jaboticabal**: v. 25, n. 3, p. 364-367.

DYCE KM, SACK WO, WENSING CJG 2010. Tratado de anatomia veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**.

ECHEVARRIA FAM 2004. Fasciolose. **Rev Bras Parasitol Vet**: v.13, suplemento 1.

ECHEVARRIA FAM 1995. Mesa Redonda sobre Fasciolose Bovina. **A Hora Veterinária Ed Extra**: n.1, p.27-31.

EL SAYED MH, ALLAM AF, OSMAN MM 1997. Prevention of human fascioliasis: a study on the role of acids detergents and potassium permanganate in clearing salads from metacercariae. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**: 27, 163-169.

ESTEBAN JG, FLORES A, AGUIRRE C, STRAUSS W, ANGLES R, MAS-COMA S 1997. Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. **Acta tropica** – Elsevier.

ESTRELA C, ESTRELA CRA, BARBIN EL, SPANÓ JCE, MARCHESAN MA, PÉCORA JD 2002. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. 1Faculty of Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil 2Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. **Braz Dent J** 13(2): 113-117. ISSN 0103-6440.

FAIRWEATHER I 2011. Reducing the Future Threat From (Liver) Fluke: Realistic Prospect or Quixotic Fantasy? **Vet Parasitol.** 180: 133–143.

FAIRWEATHER I, THREADGOLD L, HANNA REB 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the Mammalian Host. In: Fasciolosis. 1ª edição. **CAB International:** p.47-111.

FARIA RN, CURY MC, LIMA WS 2005. Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in brazilian cattle. **Revue Médecine Vétérinaire:** v. 156, n. 2, p. 86.

FOREYT WJ 2005. **Parasitologia Veterinária:** Manual De Referência. Editora Roca. 5ª ed. São Paulo.

GIRÃO ES, UENO H 1985. Técnica de Quatro Tamises Para o Diagnóstico Coprológico Quantitativo da Fasciolose dos Ruminantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira:** v. 20, n. 8, p. 905-912.

GOMES FF 2003. **Estudo e um foco de Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio De Janeiro.** 2003. 68f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes.

GOMES FF, OLIVEIRA FCR, PILE EA, LOPES CWG 2002. Estabelecimento de Foco de Fasciolose hepática em Propriedade do Município de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária:** v.11, n.2, p.53-56.

GONZALES JC, SANCHES VM, TOMÉ JW, GONÇALVES PC, OLIVERIA CBM 1974. *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* L. no Rio Grande do Sul-Brasil. **Arch Fac Med Vet Rio Grande do Sul:** 2: 37-40.

GONZÁLEZ-LANZA C, MANGA-GONZÁLEZ Y, DEL-POZO-CARNERO P, HIDALGO-ARGUELLO R 1989. Dynamics of Elimination of Eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the Faeces of Cattle in the Porma Basin, Spain. **Vet Parasitol:** v. 34, p. 35-43.

GUIMARÃES MP 2016. *Fasciola hepatica*. Em: NEVES, DP. Parasitologia Humana. 13ª ed. São Paulo. Ed Artheneu: p. 223-226.

HONER MR 1979. Aspectos da Epidemiologia da Fasciolose. Em: Seminário Nacional sobre Parasitoses de Bovinos, Campo Grande. Anais. Campo Grande: **EMBRAPA/CNPGC;** 386p.

HUSSEIN AN, HASSAN IM, KHALIFA RM 2010. Desenvolvimento e mecanismo de eclosão de ovos de *Fasciola*, estudos microscópicos de luz e microscopia eletrônica de varredura. **Saudi J Biol Sci** Jul: 17 (3): 247-51.

IGREJA RP, BARRETO MG, SOARES MS 2004. Fasciolíase: Relato de Dois Casos em Área Rural do Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop:** v. 37, n. 5, p.416-7.

JUNQUEIRA LCU, BIGNOLASB G, BRENTANI R 1979. Picrosirius Staining Plus Polarization Microscopy, a Specific Method for Collagen Detection in Tissue Sections. **Histochem J**: 11: 447-455.

KENDALL SB 1950. Snail hosts of *Fasciola hepatica* in Britain. *J. Helminthol*:v. 24,p. 63-74.

KNUBBEN-SCHWEIZER G, TORGERSON PR 2015. Bovine fasciolosis: Control strategies based on the location of *Galba truncatula* habitats on farms. **Vet Parasitol**: 208: 77-83.

LIMA WS, BARÇANTE JMP, BARÇANTE TA, GUIMARÃES MP, SOARES LRM 2009. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) Infection in Brazilian Cattle in the State of Minas Gerais. **Rev Bras Parasitol Vet**: 18(2): 27-30.

LUTZ A 1921. 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.

MACIEL MG, LIMA WS, DE ALMEIDA FLMA, COELHO LIARC, ARAÚJO GANA, LIMA MG, MACIEL LHG, PEREIRA CAJ, MACIEL TCS, GUERRA JAO, SANTANA RAG, GUERRA MGVB 2018. Cross-Sectional Serological Survey of Human Fascioliasis in Canutama Municipality in Western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology Research**: v. 2018, p.1-8.

MAS-COMA S, BARGUES M, VALERO M 2018. Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. **Parasitology**: v.145(13), p.1665-1699.

MAS-COMA S, BARGUES MD 1996. Human liver Sven. Vetenskapsakad. Handlingar, Fjarde Serien 3: 1- flukes: a review. In Atlas of infectious diseases. U.S. Armed 223+5 pl. **Forces Institute of Pathology Washington DC** (in press).

MAS-COMA S, ESTEBAN JG, BARGUES MD 1999. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. **Bulletin of the World Health Organization**: v. 77, n. 4, p. 340 – 46.

MATTAR FJA, AMARAL ADF 1967. "Sôbre um caso humano de fasciolíase hepática". **Folia Clínica et Biologica**: v.36:p. 56-67.

MATTOS MJT, UENO H 1982. **Produtividade de rédias e metacercárias de *Fasciola hepatica* L. 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 e *L. viatrix* Orb, 1835**. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 7. Porto Alegre.

MENDES EA 2006. **Comportamento e desenvolvimento do *F. hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagui (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*)**. 2006. 135f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MOAZENI M, AHMADI A 2016. Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. **Experimental Parasitology**: Volume 169, Pages 81-89, ISSN 0014-4894.

MORETTI CL 2007. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças /** Celso Luiz Moretti — Brasília: Embrapa Hortaliças. 531 p. ISBN 978-85-7333-431-9. 1. Frutas e Hortaliças – Processamento mínimo. I. Título. CDD.

MÜLLER G, BERNE MEA, RAFFI LL, JESUS LP, PAULSEN RMM, SINKOC AL 1999. Influência da Temperatura na Longevidade Infectiva de Metacercárias de *Fasciola hepatica*. **Rev Bras Agroc:** v. 5, n. 3, p. 164-165.

MÜLLER G. Fasciolose. In: RIET-CORREA F, SCHILD AL, MÊNDEZ MDC 1998. **Doenças de Ruminantes e Equinos.** Pelotas Universitária UFPel: 659p.

MUNGUÍA-XÓCHIHUA JA, IBARRA-VELARDE F, DUCOING-WATTY A, MONTENEGRO-CRISTINO N, QUIROZ-ROMERO H 2007. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and Fecal Analysis) in Ruminants From a Semi-Desert Área in the Northwest of Mexico. **Parasitology Research:** v.101, p.127-130.

O'NEILL SM, BRADY MT, CALLANAN JJ, MULCAHY G, JOYCE P, MILLS KHG, DALTON JP 2000. *Fasciola hepatica* Infection Downregulates Th1 Responses in Mice. **Parasite Immunol:** n. 22, p. 147-155.

OAKLEY GA, OWEN B, KNAPP NH. Production effects of subclinical liver flukes infection in growing dairy heifers. **Veterinary Record.** 1979; 104: 503-507.

OLIVEIRA A 1932. Distribuição geográfica de algumas zoonoses existentes no Rio Grande do Sul. **Revista de Zootecnia e Veterinária:** v. 19, n. 3 - 4 p. 147 – 48.

OLIVEIRA AA, NASCIMENTO AS, SANTOS TAM, CARMO GMI, DIMECH CPN, ALVES RMS, MALASPINA FG, GARCIA MHO, SANTOS DA, AGUIAR GPR, ALBURQUERQUE BC, CARMO EH 2007. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no Município de Canutama, Estado do Amazonas, Brasil. **Epidemiol Serv Saúde:** v.16 n.4 Brasília.

OLIVEIRA EL 2008. **Prevalência e Fatores Associados à Distribuição da *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 em Bovinos dos Municípios de Careagu e Itajubá, Região da Bacia Do Rio Sapucaí-Minas Gerais.** 2008.

PARAENSE WL 1986. *Lymnaea columella*: two new Brazilian localities in the states of Amazonas and Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz:** v. 81, p. 121-3.

PARAENSE WL 1983. *Lymnaea columella* in Northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz:** v. 78, p. 477-82.

PAZ-SILVA A, SANCHEZ-ANDRADE R, SUAREZ JL, PEDREIRA J, ARIAS M, LOPEZ C, PANADERO R, DIAZ P, DIEZ-BANOS P, MORRONDO P 2003. Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. **Parasitol Res:** v.91:p.328–331.

PILE E, GAZETA G, SANTOS JAA, COELHO B, SERRA-FREIRE NM 2000. Ocorrência de Fasciolose Humana no Município de Volta Redonda, RJ, Brasil. Ver **Saúde Pública**: v. 34, n. 4, p. 413-414.

Prev. Vet. Med: v. 78, p. 57-66.

PRITCHARD GC, FORBES AB, WILLIAMS DJL, SALIMI-BEJESTANI MR, DANIEL RG 2005. Emergence of Fasciolosis in Cattle East Anglia. **The Veterinary Record**: v. 5.

QUEIROZ VS, LUZ E, LEITE LC, CIRIO SM 2002. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae) Estudo Epidemiológico nos Municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). **Acta Bio Par**: n. 31, p. 99-111.

REY L 1957. *Fasciola hepatica* no gado, no Rio Grande do Sul. Investigações sobre a ocorrência de casos humanos. **Rev bras Malar**: 9: 473-483.

REY L 1958. Primeiro encontro de ovos de *Fasciola hepatica* em inquérito helmintológico de populações brasileiras (Campo Grande, Mato Grosso) **Rev paul Med**: 53: 60.

REY L 2008. *Fasciola hepatica* e Fasciolíase. In: Rey L. Parasitologia. 4ª. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 500-506.

REZENDE, H. E. B. et al. **Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no Estado do Rio de Janeiro. (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae).** *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*, 3: 21-3, 1973.

RIBEIRO VMA 2016. **Cinética da infecção por *Fasciola hepatica* em *Lymnaea* (=Pseudosuccinea) columella proveniente do município de Confins - Minas Gerais.** Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Belo Horizonte – MG.

RIBEIRO VMA, COAGLIO AL, OLIVEIRA FLP, PEREIRA CAJ, LIMA WDS 2017. Dynamics of haemocytes from *Pseudosuccinea columella* circulating infected by *Fasciola hepatica*. **Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal**: v. 26, n. 4, p. 411-418

ROBERTS JA, SUHARDONO M 1996. Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. **International Journal for Parasitology Oxford**: v. 26, n. 9, p. 971-981.

ROGERS AB, DINTZIS SM 2012. Liver and Gallbladder. In: Comparative Anatomy and Histology: **A Mouse and Human Atlas**. Elsevier Inc. All rights reserved: p.193 – 201.

ROJO-VÁZQUEZ FA, MEANA A, VALCÁRCEL F, VALLADARES MM 2012. Uptade on Trematode Infections in Sheep. **Veterinary Parasitology**: Volume 189, Issue 1, p. 15–38.

RUBEL D, PREPELITCHI L, KLEIMAN F, CARNEVALE S, WISNIVESKY-COLLI C 2005. Estudio de foco en un caso de fasciolosis humana en Neuquén. *Medicina* (Buenos Aires): 65 ,p. 207-212.

RUSHTON B, MURRAY M 1977. Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**:v. 87, (3), p. 459-470.

SANTOS CS, SCHERER PO, VASCONCELLOS MC, PILE EM, FREIRE LS, SANTOS JAA, SERRA-FREIRE NM 2000. Registro de *Fasciola hepatica* em Equinos (*Equus caballus*), Caprinos (*Capra hircus*) e Ovinos (*Ovis aries*) no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **R Bras Ci Vet**: v. 7, n. 1, p. 63-64.

SANTOS L, VIEIRA TE 1965/1967. Considerações sobre os sete primeiros casos de fasciolose humana no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Rev Inst Adolfo Lutz**: 25-27/ 95-100.

SANTOS NR 1967. Inquérito coprológico, sorológico e médico-social realizado em Ilhéus e Uruçuca-Bahia pela VII Bandeira Científica do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em janeiro de 1967. **Rev Med** (S. Paulo): 51: 38-70.

SERRA-FREIRE NM 1990. Fasciolose no Vale do Paraíba. **Revista AGROTÉCNICA CIBA-GEIGY**: v. 14, p. 14 - 19.

SERRA-FREIRE NM 1995. Fasciolose hepática. **A Hora Veterinária**: n. 1, p. 13 - 18. Edição Extra.

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

SERRA-FREIRE NM, BORDIN EL, LESSA CSS, SCHERER PO, FARIAS MT, MALACCO MA, CORRÊA TC, TSCHUMI JA 1995. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**: n. 1, p. 19 - 21. Edição Extra.

SERRA-FREIRE NM, NUERNBERG S 1992. Dispersão Geopolítica da Ocorrência de *Fasciola hepatica* no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro: v. 87, p. 263 - 269. Suplemento I.

SILVA RE, LIMA WS, CALDAS WS, CURY MC, MALACCO AF 1994. 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**: Supl., v. 23, n. 2.

SPITHILL TW, PIEDRAFITA D, SMOOKER PM 1997. Immunological approaches for the control of fasciolosis. **International Journal for Parasitology**: v. 27, n. 10, p. 1221-1235, 1997.

STOLL NR 1947. This wormy world. **J Parasitol.**33:1-18.

TAYLO EL 1965. *La fascioliasis y el distoma hepático*. Roma, FAO, (FAO: **Estudios agropecuários**, 64).

THORPE E 1965. An immunocytochemical study with *Fasciola hepatica*. **Parasitology**: v.55(2), p.209-214.

TORGERSON P, CLAXTON J 1999. Epidemiology and Control. In: Fasciolosis. 1ª edição. **CAB International**: p.113-149.

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

UKUKU DO, FETT WF 2002. Relationship of Cell Surface Charge and Hydrophobicity to Strength of Attachment of Bacteria to Cantaloupe Rind†. **J Food Prot**: v.65 (7): p. 1093–1099.

UKUKU DO, FETT WF, SAPERS GM 2004. INHIBITION OF *Listeria monocytogenes* BY NATIVE MICROFLORA OF WHOLE CANTALOUPE. **Journal of Food Safety**: v.24, (2),p. 129-146.

VIEIRA NP, FARIA PB, MATTOS MR, PEREIRA AA 2011. Condemnation of Bovine Liver in the Southern Region of the State Espírito Santo, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**: v.63, n.6, p.1605-1608.

WANG CR, QIU, JH, ZHU XQ, HAN XH, NI HB, ZHAO JP, ZHOU QM, ZHANG HW, LUN ZR 2006. Survey of Helminths in Adult Sheep in Heilongjiang Province, People's Republic of China. **Veterinary Parasitology**. v. 140, p.378–382.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 1995. Control of foodborne trematode infections. **WHO Technical Report Series** 849, 1–157.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2007. **Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control**. World Health Organization Headquarters Geneva: 17–18 October WHO/CDS/NTD/PCT/2007.1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2008. **Fact sheet on fascioliasis**. In: Action Against Worms, World Health Organization Headquarters Geneva (December): Newsletter 10, 1–8.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2013. **Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases**. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, Geneva World Health Organization WHO Headquarters: 128 pp.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2014. Foodborne Trematodiasis. **WHO Media Centre Fact Sheet**: No. 3.

YILMA JM, MESFIN A 2000. Dry season bovine fasciolosis in Northwestern part of Ethiopia. **Revue Méd Vét**: 2000, 151, 6, 493-500.