

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Dissertação de Mestrado

ASPECTOS DA INFECÇÃO POR *SCHISTOSOMA MANSONI* (SAMBON, 1907) EM
OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS

Jordana Costa Alves de Assis

Belo Horizonte
Fevereiro, 2016

Jordana Costa Alves de Assis

ASPECTOS DA INFECÇÃO POR *SCHISTOSOMA MANSONI* (SAMBON, 1907) EM
OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Dr. Walter dos Santos Lima

Coorientador: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Belo Horizonte

Fevereiro, 2016

Jordana Costa Alves de Assis

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Helminologia Veterinária, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, com colaboração junto ao Laboratório de Referência em Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais- Brasil e o Departamento de Patologia, Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo-Brasil.

Orientador

Prof. Dr. Walter dos Santos Lima

Laboratório de Helminologia Veterinária

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Laboratório de Referência em Esquistossomose

Centro de Pesquisas René Rachou- Fiocruz- Minas Gerais

Colaborador

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Departamento de Patologia

Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo

Órgão Financiador: CAPES

Belo Horizonte

Fevereiro, 2016

*“E nesse andejar em frente,
Sem procurar recompensa,
Fui vendo- na diferença,
Entre passado e presente,
Que a lembrança de um ausente,
Tem mais força que a presença!”*

Jayme Caetano Braun

Aos meus amigos bichos, *Brutus e Baliza*,
Que me deixaram durante a jornada do mestrado.
Compreendam-me como a nenhum humano.
Juntos, os três mateiros!
A bússola era vocês.
Aos queridos amigos, *Luana e Jair Miguel (Cabeludo)*.
E também ao *Tio João e Vó Lia*.
“O tempo que nos separa, é o que mais nos aproxima...”
Saudades

Agradecimentos

Agradeço a algo maior, por permitir que eu respire e viva, chore e sorria e conquiste meus sonhos com humildade, luta e realismo. Tudo passa!

Ao protetor e amigos, sempre ao meu lado sussurrando bons conselhos, acalmando minhas iras, tristezas e angústias, vigiando meus passos e protegendo meus caminhos. Sei que sua tarefa não é fácil!

À minha família devo tudo o que sou e o que conquistei. Admiro imensamente minha mãe Celina, por sua luta que dura toda a vida, por me ensinar a ficar de pé em momentos difíceis e por me ver e me fazer sentir como uma criança.

À minha avó Arlete, mulher guerreira que carrega contigo a força e a fé em Deus e na vida. Por seus eternos ensinamentos, aos quais, em grande parte não são falados ou ouvidos, são testemunhados e tornaram-se exemplos a serem seguidos por filhos e netos. A forte e doce matriarca da família.

Janderson, meu irmão. Esse menino é meu melhor amigo e confidente. Admiro por sua maturidade e me assusto com a serenidade e seriedade dos seus conselhos, ainda mais por ser mais jovem que eu. Meu companheiro de horas alegres e tristes, sempre compreensivo e generoso com o mundo e as pessoas. Espero estar ao seu lado e poder lhe ajudar a vencer; tenho isso como uma missão.

Digo sempre que *“não tenho amigos e sim, anjos ao meu redor e toda vez que despenco no abismo, eles mergulham num voo e pegam-me no ar”*. Sei que para muitos nesse período estive ausente, mas compreendem que jamais esqueceria o amor e a lealdade que tenho. Citar nomes seria correr risco de esquecer momentaneamente um ou outro. Por isso, aqueles verdadeiros amigos saberão que essa mensagem é endereçada a vocês.

Muito obrigada ao Professor Vitor Márcio Ribeiro, pela forma de ensino tanto em sala de aula, quando fui sua discente e orientada no curso de Medicina Veterinária PUC-Minas, quanto pela oportunidade de aprendizado e vivência proporcionado aos estudantes no Programa ChiCão, o que foi essencial para que eu superasse os desafios no mestrado. Essas experiências fizeram com que eu tivesse muito gosto e vontade pela pesquisa, extensão e docência, seja no âmbito de animais de companhia ou de produção, mas sempre a favor de

ações mais justas para animais e humanos, quaisquer que sejam suas condições de vida. O senhor é um exemplo para mim.

Chegar ao final do mestrado foi mais que concluir um programa de pós-graduação, foi compreender em parte que as dificuldades são, na verdade, para a minha evolução como ser humano. O aprendizado vai muito além da pesquisa, do laboratório, do campo e das descobertas. O aprendizado maior é a forma como encaramos a vida e suas várias faces. Diante disso agradeço a todos que passaram por meu caminho nesse período, pois sei que nada foi por acaso.

Muito obrigada aos funcionários do ICB-UFMG que contribuíram pra meu conforto nessa jornada.

Sumara é um anjo que me deu apoio em todos os momentos; sem piegas, toda vez que temos um diálogo e ela me ajuda a solucionar algum problema, associo sua proteção a de uma mãe, que aconselha seus filhos e faz o melhor para todos. Você é, sem dúvida, um exemplo de profissional e de ser humano.

À Dona Aparecida, agradeço por sua alegria contagiante, sua esperança que irradia a todos e suas palavras conselheiras.

Ao “Sô” Nery, sempre tão alinhado no trabalho, com uma educação e postura invejável, prova de que não é necessário ser doutor para ser um cavalheiro; muita saúde e longevidade ao senhor.

Muito obrigada ao meu coorientador, o Professor Paulo Marcos Zech Coelho pelo apoio, disponibilidade, atenção e por permitir que eu fizesse parte das minhas análises no LESQ-Centro de Pesquisas René Rachou- Fiocruz. O senhor e toda a sua equipe estão de parabéns com o compromisso e a organização para com os estudos e as pessoas.

Agradeço também a ajuda e dedicação das pessoas que trabalham, estudam e/ou pesquisam no LESQ- CPqRR. Quando cheguei lá fui muito bem recebida por todo o pessoal a minha volta e sempre que precisava de qualquer material ou orientação, havia alguém ao meu lado, como a Gardênia, Paty, Nathy, Thaís, Áureo, Neusa e, em especial, à Diana, que com toda a sua doçura, paciência e boa didática me ensinou técnicas importantes e também tivemos boas conversas e risadas (espero ter sido uma boa pupila, Diana!). Contem sempre comigo.

Não posso deixar de mencionar o professor Fausto Edmundo Lima Pereira, que foi de suma importância para que esse trabalho tivesse a sua parte de patologia descrita com qualidade. Fui recebida em Vitória-Espírito Santo, como alguém de sua família e a confiança e dedicação depositada em mim foi surpreendente. A experiência, clareza e simplicidade aplicada nos momentos em que estive presente junto ao Professor Fausto jamais serão esquecidas. Muito obrigada, Professor!

Quando entrei no laboratório de Helminologia Veterinária, não conhecia ninguém. Aos poucos fui percebendo que estava inserida numa grande família e com vários irmãos, cada um com sua personalidade, como as diversas espécies de peixes no rio. Presenciamos momentos de alegria, tristeza, raiva, serenidade, separações e confraternizações. Com cada um aprendi um pouquinho. Valeu a pena ter conhecido pessoas tão distintas. Além do aprendizado, foi um grande desafio conviver com as virtudes e limitações de cada um e sei que o mesmo ocorreu em relação a mim. Dessa forma, agradeço a Eveline, Ruth, Lanuze, Cíntia, Vinícius, Franciellen, Lara, Hudson, Leonardo, Rodolfo, Rosália, Paula e Aytube por cada dia em que tive a oportunidade de estar próxima a vocês e pela compreensão das minhas imperfeições.

Quando fui à fazenda onde estavam os animais que foram essenciais para meu estudo, imaginei que aquele rebanho era de cabras (nunca havia visto ovelhas sem lã, de cor preta, com pernas compridas e finas), nem tampouco conhecia de manejo e avaliação clínica de ovinos. Tive que aprender do zero, mas com a ajuda de pessoas muito boas, que me auxiliaram para que tudo ocorresse bem. A minha gratidão ao João por seu apoio e questionamentos proveitosos, à Iaiá por sua alegria, desabafos engraçados e exemplo da luta que a mulher no campo enfrenta e merece vencer e ser reconhecida. Meu mais sincero sentimento fraterno dedico ao Josué, um ser humano com o coração puro, uma simplicidade encantadora com seu jeito único de ser, sábio nas poucas palavras que pronuncia, um exemplo de consciência da importância à natureza e respeito aos animais e prova de que com pouco podemos viver em harmonia com a vida. Admiro e aprendi muito com vocês!

Não posso deixar de dizer que sem o acolhimento do Professor Walter dos Santos Lima, eu jamais teria chegado até aqui. À princípio, o via como um professor severo e desafiador que me fazia temer até sua sombra. Digo que durante muito tempo tentei decifrar sua personalidade, sua rigidez e abandono. Sempre desconfiada. Aos poucos fui percebendo um senhor diferente daquele que tinha em mente, não era severidade, era disciplina, mas ainda assim desafiador. Sua rigidez e abandono começaram a ser compreendidos como

ensinamentos preciosos: aprender a procurar ajuda, dar valor ao trabalho, ter consciência de que sozinhos não chegamos a lugar algum e que nem sempre na vida lá fora terei alguém superior a mim para me defender e a vitória está em minhas mãos, mas respaldadas por outras.

Aprendi com o Professor que por mais que estudamos parasitologia, o conhecimento nunca cessa, pois a realidade que se renova a cada dia é distinta das páginas que encontramos nos livros e envolve mecanismos que apenas a vivência e experiência podem trazer as respostas. Por fim, notei que Professor Walter tem um jeito próprio indecifrável, não pela complexidade, mas pela simplicidade do homem rústico do campo que vive em si e isso jamais poderá ser explicado, apenas compreendido.

Sei que não fui um exemplo de orientada e que muitas vezes foi eu a desafiadora no ato da paciência do senhor, com minha rebeldia e intolerância. Queria ter feito algumas coisas de forma diferente, mas creio que precisei passar por cada dificuldade e sofrimento para ter a consciência de que ainda é só o começo, ainda tenho muito que percorrer. Hoje tenho consciência de que pouco sei e me alegro por isso, a luta continua. Muito obrigada, Professor. Tenho muita consideração pelo senhor. Espero um dia poder retribuir nem que seja um pouco o que senhor me proporcionou.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Schistosoma mansoni</i>	1
1.2 Histórico	2
1.3 Biologia	4
1.4 Patogenia	5
1.5 Diagnóstico	7
1.5.1 Métodos parasitológicos	7
1.5.2 Imunodiagnóstico	8
1.5.3 Métodos moleculares	9
1.6 A Infecção em mamíferos não humanos	9
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. MATERIAIS e MÉTODOS	14
4.1 Animais	14
4.2 Infecção	14
4.2.1 Obtenção de cercárias	14
4.2.2 Infecção por via cutânea	15
4.3 Parâmetros clínicos	16
4.3.1 Avaliação clínica	17
4.3.2 Perfil hematológico	17
4.3.2.1 Coleta de sangue	17
4.3.2.2 Perfil de células vermelhas	18
4.4 Parâmetros imunológicos	18
4.4.1 Contagem total de leucócitos	18
4.4.2 Contagem diferencial de leucócitos	19
4.4.3 Imunoglobulina G sérica	19
4.5 Parâmetros parasitológicos	20
4.5.1 Exame parasitológico de fezes	20
4.5.2 Método de eclosão de miracídios	20
4.5.3 Curetagem de mucosa retal	21
4.5.4 Detecção de antígeno na urina	22
4.5.2 Avaliação <i>post mortem</i>	24
4.5.2.1 Aspectos patológicos	24
4.5.2.2 Recuperação de <i>Schistosoma mansoni</i> em órgãos	24
4.5.2.3 Recuperação de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> em órgãos	26
4.6 Delineamento estatístico	25
4.7 Considerações éticas	26
5. RESULTADOS	26
5.1 Infecção	26
5.2 Parâmetros clínicos	26
5.2.1 Avaliação clínica	26
5.2.2 Perfil hematológico	35
5.2.2.1 Contagem total de hemácias	35
5.2.2.2 Hematócrito	35
5.2.2.3 Volume globular médio	35

5.2.2.4 Hemoglobina	35
5.2.2.5 Plaquetas	36
5.3 Parâmetros imunológicos	42
5.3.1 Contagem total de leucócitos	42
5.3.2 Contagem diferencial de leucócitos	42
5.3.2.1 Neutrófilos segmentados do sangue periférico	42
5.3.2.2 Neutrófilos bastonetes do sangue periférico	42
5.3.2.3 Linfócitos do sangue periférico	42
5.3.2.4 Eosinófilos do sangue periférico	43
5.3.2.5 Monócitos do sangue periférico	43
5.3.2.6 Basófilos do sangue periférico	43
5.3.3 Imunoglobulina G sérica	51
5.4 Parâmetros parasitológicos	53
5.4.1 Exame parasitológico de fezes	53
5.4.2 Método de eclosão de miracídios	54
5.4.3 Curetagem de mucosa retal	55
5.4.4 Detecção de antígeno na urina	56
5.4.5 Avaliação <i>post mortem</i>	58
5.4.5.1 Aspectos patológicos	58
5.4.5.1.1 Ovino 01	57
5.4.5.1.2 Ovino 03	59
5.4.5.1.3 Ovino 06	60
5.4.5.1.4 Ovino 07	61
5.4.2 Recuperação de <i>Schistosoma mansoni</i> em órgãos	72
5.4.3 Recuperação de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> em órgãos	76
6.0 DISCUSSÃO	79
6.1 Parâmetros clínicos	79
6.1.1 Avaliação clínica	79
6.1.2 Perfil hematológico	81
6.1.3 Contagem total e diferencial de leucócitos	82
6.2.2 Resposta imune humoral- IgG sérica	83
6.3 Parâmetros parasitológicos	84
6.3.1 Diagnóstico da infecção por métodos diretos	84
6.3.3 Método indireto- Detecção de antígeno na urina	85
6.4 Aspectos <i>post mortem</i>	86
6.4.1 Patologia	86
6.4.2 <i>Schistosoma mansoni</i> e ovos	89
7. CONCLUSÕES	92
8. REFERÊNCIA	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Procedimento para obtenção e quantificação de cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> -.....	15
Figura 2: Infecção experimental de ovinos da raça Santa Inês por <i>Schistosoma mansoni</i>	16
Figura 3: Métodos de eclosão de miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i>	21
Figura 4: Método de curetagem de mucosa retal em ovinos infectado por <i>Schistosoma mansoni</i>	22
Figura 5: Metodologia para coleta de amostra e diagnóstico de antígeno de <i>Schistosoma mansoni</i> em ovinos	23
Figura 6: Digestão de fígado de ovino infectado experimentalmente por via cutânea com <i>S. mansoni</i>	25
Figura 7: Exame parasitológico de fezes pela técnica de Girão e Ueno (1982) para detecção de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>	54
Figura 8: Teste para detecção de antígeno na urina em ovinos infectados pela via cutânea com 2.000 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	57
Figura 9: Aspecto macroscópico ao exame <i>post mortem</i> de fígados dos ovinos infectados experimentalmente com média de 2.000 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> por via cutânea	64
Figura 10: Aspecto microscópico ao exame <i>post mortem</i> de fígados dos ovinos infectados experimentalmente com média de 2.000 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> por via cutânea	66
Figura 11: Aspecto microscópico ao exame <i>post mortem</i> de fígados dos ovinos infectados experimentalmente com média de 2.000 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> por via cutânea	68
Figura 12: Aspecto microscópico ao exame <i>post mortem</i> de fígados dos ovinos infectados experimentalmente com média de 2.000 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> por via cutânea	70
Figura 13: Aspecto macroscópico e microscópico ao exame <i>post mortem</i> dos pulmões do ovino 03 infectado experimentalmente com média de 2.000 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> por via cutânea	71
Figura 14: Recuperação de parasitos <i>Schistosoma mansoni</i> no fígado e nos vasos mesentéricos de ovinos infectados experimentalmente com 2.000 cercárias por via cutânea	74

Figura 15: Recuperação de parasitos <i>Schistosoma mansoni</i> no fígado e nos vasos mesentéricos de ovinos infectados experimentalmente com 2.000 cercárias por via cutânea. Parasitos fixados com carmim acético	75
Figura 16: Recuperação dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> no fígado e intestino delgado e grosso de ovinos infectados experimentalmente com 2.000 cercárias por via cutânea	78
Figura 17: A- ovinos em local alagadiço à beira de lagoa para pastejo de forragens (Notar a falta de pasto para os animais à esquerda e forragens em local alagadiço ao fundo). B- ovino ingerindo água em beira de lagoa com os membros em contato direto com água	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Avaliação média e desvio padrão da coloração de mucosa pelo método Famacha® em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	29
Gráfico 2: Peso médio e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	30
Gráfico 3: Escore corporal médio e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	31
Gráfico 4: Frequência cardíaca média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	32
Gráfico 5: Frequência respiratória média e desvio padrão ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	33
Gráfico 6: Temperatura retal média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	34
Gráfico 7: Número médio de hemácias e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	37
Gráfico 8: Porcentagem média e desvio padrão de hematócrito em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	38
Gráfico 9: Volume Globular Médio e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	39
Gráfico 10: Hemoglobina (g/dl) média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	40
Gráfico 11: Quantificação de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	41

Gráfico 12: Contagem total de leucócitos média e desvio padrão em ovinos controles e infectado por <i>Schistosoma mansoni</i>	44
Gráfico 13: Contagem específica de neutrófilos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	45
Gráfico 14: Contagem específica de neutrófilos bastonetes por porcentagem média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	46
Gráfico 15: Contagem específica de linfócitos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	47
Gráfico 16: Contagem específica de eosinófilos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	48
Gráfico 17: Contagem específica de monócitos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	49
Gráfico 18: Contagem específica de basófilos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	50
Gráfico 19 (A e B): Cinética de anticorpos IgG média e desvio padrão, que reagem com antígeno de <i>Schistosoma mansoni</i> em ovinos controles e infectados	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Variação do peso médio de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> durante o período de experimento	28
Quadro 2: Recuperação de parasitos <i>Schistosoma mansoni</i> em ovinos experimentalmente infectados por via cutânea com 2.000 cercárias	73
Quadro 3: Recuperação de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> pela técnica de digestão com KOH a 5%, no fígado e no intestino delgado e grosso de ovinos infectados experimentalmente com 2.000 cercárias por via cutânea	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado de curetagem de mucosa retal, realizado em ovinos infectados experimentalmente com 2.000 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> por via cutânea	55
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CCA- Circulating Catodic Antigen

CPqRR- Centro de Pesquisas René Rachou

dpi- dias após infecção

EDTA- Ethilenediamine Tetraacetic Acid

ELISA- Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FC- Frequência cardíaca

FR- Frequência Respiratória

HB- Hemoglobina

HT- hematócrito

IgG- Imunoglobulina G

KOH- Hidróxido de Potássio

LESQ - Laboratório de Esquistossomose

PBS- Phosphate Buffered Saline

PCR- Polymerase Chain Reaction

SWAP- Soluble Worms Adult Antigen

TMB- *Tetramethylbenzidine*

TR- Temperatura Retal

VGM- Volume Globular Médio

WHO- World Health Organization

RESUMO

A esquistossomose mansoni é causada pelo trematoda *Schistosoma mansoni*, sendo impactante na saúde pública de vários países, principalmente subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Muito se pesquisa sobre a infecção em seres humanos, porém, são escassos os estudos sobre a susceptibilidade dos animais domésticos à infecção, como os ovinos, sendo que no Brasil, há aumento gradual da criação desses animais, como a raça Santa Inês, devido a sua produtividade e rusticidade, sendo a raça deslanada muito criada no nordeste brasileiro. O objetivo desse estudo foi avaliar aspectos da susceptibilidade em ovinos da raça Santa Inês à infecção por *S. mansoni*, assim como fatores clínicos, hematológicos, parasitológicos e patológicos no período de 0 a 255 dias. Os ovinos do presente estudo foram segmentados em dois grupos com 5 animais livres da infecção (Controle) e 5 infectados por via cutânea com 2.000 cercárias de *S. mansoni* (Infectado). A avaliação clínica foi realizada para acompanhar variáveis como peso e escore corporal, além do sistema cardiovascular, respiratório, digestório e análise de coloração de mucosa da conjuntiva ocular. Foram coletadas amostras sanguíneas para realização do perfil hematológico e cinética de anticorpos IgG. Para analisar os parâmetros parasitológicos, no diagnóstico foram realizados exames de fezes pelo método de sedimentação espontânea e pelo método de quatro tamises modificada, assim como métodos de eclosão de miracídios, curetagem de mucosa retal e detecção de antígeno pelo teste rápido de urina. Os ovinos foram sacrificados em dois intervalos: aos 135 dpi e aos 255 dpi, sendo os órgãos avaliados. Além disso, foi preconizada a perfusão das vísceras para recuperação de parasitos nos vasos mesentéricos e espaço porta e a recuperação de ovos nos tecidos. Como resultado, na avaliação clínica, houve perda de peso no grupo Infectado de 15 aos 75 dpi com ganho compensatório, mas não o suficiente para igualar ao Controle, além de fezes amorfas. À análise hematológica, foram constatados índices menores nas variáveis de células vermelhas e aumento na contagem total de leucócitos e diferencial de neutrófilos na fase aguda, assim como aumento na contagem diferencial de eosinófilos do sangue periférico de 75 aos 195 dpi. A cinética de IgG mostrou-se alta a reatividade no grupo Infectado, o que evidencia uma resposta imune humoral mais intensa na fase aguda pós postural ao comparar-se as duas titulações, concomitante com os achados clínicos e hematológicos, podendo ser utilizada como ferramenta para imunodiagnóstico da esquistossomose mansoni em ovinos. Quanto aos parâmetros parasitológicos, no diagnóstico foram obtidos os seguintes resultados: (i) não foram observados ovos ou miracídios nas amostras dos ovinos da raça Santa Inês infectados, entretanto, (ii) a técnica de Girão e Ueno (1982) foi validada para o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* em hospedeiros ruminantes, (iii) a curetagem de mucosa retal foi capaz de detectar a infecção nos ovinos e (iv) o teste rápido de urina acusou detecção de antígenos, mas com traço leve, devendo ser aprimorada. Nos aspectos *post mortem*, na patologia dos ovinos da raça Santa Inês infectados foram observadas no fígado e pulmão: (i) pouca frequência de granulomas típicos formados em torno de ovos de *S. mansoni* e (ii) frequente lesões focais, esparsas, nodulares, formadas por granulomas extensos, contendo material amorfo envolto de exsudato de células inflamatórias e graus variáveis de neoformação conjuntivo vascular. Na recuperação de parasitos nos vasos mesentéricos e espaço porta, houve heterogeneidade entre os ovinos com variações de 0,45 a 5,45%. Além disso, os espécimes de *S. mansoni* mostraram-se menores em tamanho se comparados aos obtidos na infecção humana e em bovinos. Dessa forma, conclui-se que ovinos da raça Santa Inês não apresentam importância epidemiológica na transmissão de *S. mansoni*, uma vez que não eliminam ovos nas fezes. Entretanto, esses animais são susceptíveis a infecção, visto que há desenvolvimento parasitário e oviposição das fêmeas, além de sintomas clínicos, variações hematológicas, imunológicas e lesões em órgãos como fígado e pulmão consequente ao parasitismo, levando a perdas na produtividade devido à infecção.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, Ovinos, Susceptibilidade.

ABSTRACT

The schistosomiasis is caused by trematode *Schistosoma mansoni* and is impactful on public health in many countries, particularly underdeveloped or under development countries. There are many researches regarding the infection in humans, however, there are only a few studies about the susceptibility of cattle to infection, such as in sheep. In Brazil, there is a gradual increase in the creation of these animals, such as Santa Ines breed's, due to its productivity and rusticity; without wool breed's is very established at the Brazilian northeast. The goal of this study is to evaluate aspects of susceptibility in Santa Inês sheep breed's to infection with *S. mansoni*, as well as clinical, haematological, parasitological and pathological in the period 0-255 days. The sheeps of this study were segmented into two groups of 05 animals free from infection (Control) and 05 dermally infected with 2,000 of *S. mansoni* cercariae (Infected). Clinical evaluation were performed to monitor variables such as weight and body condition score, in addition to the cardiovascular, respiratory, digestive system and mucosal staining analysis of the ocular conjunctive. Blood samples were collected to perform the hematological profile and kinetic profile of IgG antibodies. To analyze the parasitological parameters, diagnosis were performed through examinations by spontaneous sedimentation method and the four modified sieves method, as well as miracidia hatching methods, rectal mucosal curettage and antigen detection by rapid urine test. The sheeps were sacrificed at two intervals: the 135 dpi and 255 dpi. Body organs were examined. Moreover, it was preconized the perfusion of the viscera for parasite recovery vessels in the mesenteric and portal space and eggs in the tissues were recovered. As a result, on the clinical evaluation, there was loss of weight in the infected group of 15 to 75 dpi with compensatory growth, but not enough to match the control, as well as amorphous faeces. On the hematological analysis, lower levels in the red blood cells and variable increase in the total white blood count were found as well as differential of neutrophils in acute phase and an increase in the differential count of peripheral eosinophils cells of 75 to 195 dpi. The IgG kinetics showed high reactivity in the infected group, which shows a stronger humoral immune response in post postural acute when comparing the two titrations, concomitant with clinical and hematological findings. This can be used as a tool to immunodiagnosics of schistosomiasis in sheep. Regarding the parasitological parameters, the following results were obtained on diagnosis: (i) eggs or miracidia were observed in infected samples of breed sheep Santa Inês, however, (ii) Girão and Ueno (1982) technique have been validated for diagnosis of *S. mansoni* infection in ruminants hosts, (iii) rectal mucosa's curettage were able to detect infection in sheep and (iv) the rapid test urine detected antigens, but slight traces that should be improved. In *post mortem* aspects, the pathology of the Santa Inês sheep infected was observed in the liver and the lung: (i) low frequency of typical granulomas formed around *S. mansoni* eggs and (ii) frequently focal, scattered, and nodular lesions, formed by extensive granulomas containing amorphous material wrapped in exudate inflammatory cells besides varying degrees of vascular connective neoformation. In recovered parasites at the mesenteric and portal vessels' space, there was heterogeneity among the sheep with variations from 0.45 to 5.45%. Furthermore, the specimens of *S. mansoni* were smaller compared to those obtained in human and cattle infections. Thus, it is conclusive that breed sheep Santa Inês have no epidemiological importance in the transmission of *S. mansoni* since it does not eliminate eggs in faeces. However, these animals are susceptible to infection because there is parasitic development and female oviposition as well as clinical symptoms, hematologic and immunologic changes besides organ lesions at the liver and lungs consequent to the parasitism leading to losses in productivity due to infection.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose é uma doença causada por parasitos da classe Trematoda, família *Schistosomatidae*, gênero *Schistosoma*, que afeta cerca de 200 milhões de seres humanos em 74 países do mundo (Chuah *et al.*, 2014), sendo aproximadamente 600 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (Chitsulo *et al.*, 2000; Van der Werf *et al.*, 2003; Steinmann, *et al.*, 2006). No Brasil, a esquistossomose mansoni é considerada grave problema de saúde pública, com aproximadamente oito milhões de pessoas infectadas (4,6% da população brasileira) e 30 milhões em regiões onde há transmissão de *Schistosoma mansoni*, principalmente no Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, em áreas com saneamento básico precário (Katz e Peixoto, 2000; Oliveira *et al.*, 2004).

O principal hospedeiro definitivo de *S. mansoni* é o ser humano (Nelson, 1960). Todavia, há estudos que demonstraram outros mamíferos que podem atuar como fonte de infecção (Martins *et al.*, 1955; Barbosa *et al.*, 1958; Nelson, 1960; Barbosa *et al.*, 1962; Antunes *et al.*, 1973; Coelho *et al.*, 1979; Pitchford e Visser, 1962; Piva e Barros, 1966; McCully e Kuger, 1969; Coelho *et al.*, 1982; Fenwick, 1969; Modena *et al.*, 2008). As localidades onde ocorrem as infecções e posteriormente a doença, tem como relevante fator de risco, a falta de saneamento básico e condição socioeconômica desfavorável, onde as comunidades são obrigadas a utilizar fontes de água inseguras para funções domésticas, recreativas e profissionais (Kloos *et al.*, 1998; Gazzinelli *et al.*, 1998; Prata e Coura, 2008).

Entretanto, fatores como a persistência das condições ambientais e sociais adequadas à transmissão de *S. mansoni*, podem exercer força no potencial biótico do parasito, com risco de infecção para humanos e animais, podendo levar à possibilidade de zooantroponose, o que contribui para a persistência e novos focos infecciosos (Modena *et al.*, 2008).

Dessa forma, são necessários estudos detalhados sobre a susceptibilidade de outros hospedeiros mamíferos, como os ovinos e seu possível papel na epidemiologia da doença, por estarem em contato próximo aos seres humanos e suas fontes de água.

1.2 Histórico

Alguns estudos apontam que parasitos do gênero *Schistosoma* tiveram origem no continente asiático disseminando-se para a África e posteriormente para países da América Latina (Desprès, Imbert-Establet e Monnerot, 1980).

A infecção em humanos em alguns países do continente africano ocorre há milênios, como apontou o estudo realizado com utilização da técnica de pesquisa de antígeno circulante em múmia com idade estimada em 3.200 anos a.C. e consequente detecção de antígenos de *S. haematobium*, comprovando a interação entre ambiente, ser humano e *Schistosoma* conhecida ao longo da história (Miller *et al.*, 1992).

Em 1902, o pesquisador Patrick Manson examinou amostras fecais contendo ovos com espículo lateral de paciente com naturalidade inglesa, mas que passou parte da vida na América Central, sem ter viajado ao continente africano e não ter manifestado alterações urinárias, sintomatologia anteriormente conhecida devido à infecção pela espécie *S. haematobium*, causador da doença do Egito. Havia na época, a possibilidade de existirem duas espécies de *Schistosoma* com características de apresentarem ovos espiculados, com diferença na posição relativa do espículo (polar no *S. haematobium*) e eliminação via urinária de *S. haematobium* e ovos com espículo de posicionamento lateral, de eliminação fecal na nova espécie. No ano de 1907, o pesquisador Sambon, ao examinar lâminas que continham ovos com característica de espículo lateral diferindo do parasito já conhecido, propôs uma nova espécie, nomeando-a de *S. mansoni* (Falcão, 2008).

Entretanto, ainda em 1902, o assistente da primeira cadeira de Clínica Médica, Doutor Manuel Augusto Pirajá da Silva, encontrou com frequência, ao examinar fezes de pacientes internados na Bahia, ovos de vermes com espículo lateral, mas não se esclareceu a origem (Falcão, 2008).

Em 1908, Pirajá da Silva, examinou paciente, homem jovem de 18 anos, solteiro, morador de área rural, natural do estado da Bahia e da cidade de Santo Antônio, com manifestação clínica de mucosas e conjuntivas pálidas e emagrecimento, também por queixar-se de tonturas, epistaxe e fezes com moderada presença de sangue. Além disso, surpreendentemente, foi encontrado em seu esfregaço sanguíneo, um ovo que se assemelhava aos de *S. mansoni* (o que pode presumir-se na atualidade, quanto era alto o parasitismo), fato que impulsionou o médico a pesquisar ovos com tais características de espículo lateral nas fezes, já observados por si próprio há quatro anos antecedentes ao caso relatado. Como

resultado do estudo, foram encontrados ovos com espículo lateral e de outros helmintos nas amostras fecais analisadas. Esses ovos espiculados mediam entre 126 e 162µm de comprimento, 49 e 72 µm de largura, com média de 146 µm de comprimento e 62 µm de largura. Esse relato foi a confirmação do primeiro caso autóctone de esquistossomose mansoni descrito no Brasil.

Com tais informações documentadas e publicadas, Pirajá da Silva coletou dados e amostras ao necropsiar humanos infectados. Dessa forma, foi possível encontrar parasitos adultos, machos, fêmeas e ambos em cópula, na veia porta e suas primeiras ramificações. No útero das fêmeas, encontrou a mesma característica dos ovos observados nas fezes, confirmando o agente causador da esquistossomose no Brasil, distinto do parasito causador da doença no Egito (Falcão, 2008).

Para explicar a origem da infecção por *S. mansoni* no Brasil, Pirajá da Silva (1908) procedeu com a seguinte hipótese:

“É muito provável que seja o Schistosoma “Mansoni”; como pensa Manson, uma espécie africana, introduzida no novo continente, como foi o Necator “americano”, pelos negros da África “Occidental”. A Bahia foi no tempo do “trafego” dos negros africanos um dos pontos do “Brazil” para onde se estabeleceu uma grande corrente “immigratoria”, não sendo assim para admirar que tivessem aportado doentes de “schistosomiase” e, tendo encontrado aqui os ovos deste verme condições climatéricas favoráveis, desenvolvessem e prosperassem.”

Ainda nesse estudo, Pirajá da Silva (1908) relatou as “supostas” formas de infecção, na época, apontadas por Loss, como a água de beber, dando-se a penetração do parasito na parede do estômago, intestinos e pela pele. Parte da teoria foi descartada ao colocar o “animal” numa solução de ácido clorídrico nas concentrações de 10 e 20%, quando o mesmo não resistiu, excluindo, dessa forma, a infecção pela ingestão dos ovos, que não sobrevive à acidez estomacal. Porém, já se discutia certa importância à água como veículo coadjuvante para possíveis causas nas infecções por *S. mansoni*.

Dessa forma, ressalta-se que no Brasil, já existiam hospedeiros intermediários susceptíveis e ambiente favorável ao potencial biótico do parasito (Almeida Machado, 1982).

1.3 Biologia

Os ovos de *S. mansoni* contendo miracídios são liberados nas fezes de hospedeiros vertebrados. Os miracídios eclodem em contato com a água e infectam moluscos do gênero *Biomphalaria* (Lenzi *et al.*, 2008). Com o desenvolvimento, sofrem transformação morfológica, caracterizando esporocistos. O período de infecção dos moluscos à emergência de cercárias decorre entre 27 a 30 dias, com saída ativa pelo tegumento nas horas mais claras e quentes do dia, horário em que muitos animais e humanos utilizam água para refrescar-se e em demais atividades (Carvalho; Coelho e Lenzi, 2008).

As cercárias em contato com a derme e mucosas realizam movimentos retrógrados e penetram sem necessidade de soluções de continuidade (Lenzi *et al.*, 2008), estimuladas por lipídeos específicos, que envolve orientação para sítios de entrada, aderência pela ventosa oral, atividade muscular e secreção glandular de enzimas proteolíticas (Carvalho, Coelho e Lenzi, 2008). O tempo de penetração varia entre 10 a 15 minutos (Cunha, 1970) com troca de respiração aeróbica por anaeróbica com perda do glicocálix, caracterizando o esquistossômulo (Stirewalt, 1974).

Após o meio extra vascular, os esquistossômulos têm trajeto intravascular, pela microcirculação sanguínea, favorecida pela reação inflamatória com vasodilatação, sendo encontrados nos pulmões a partir de quatro dias (Barbosa *et al.*, 1978), com permanência até o 20° a 22° dias, dependendo do modelo experimental utilizado (hamsters e camundongos respectivamente) (Carvalho; Coelho e Lenzi, 2008). Outro sítio de migração dos esquistossômulos menos frequente, são vasos linfáticos (Pearce e McLaren, 1986).

De forma gradativa, os parasitos atingem o sistema intra-hepático a partir do 8° dia pós-infecção, podendo ser encontrados em diferentes estádios, ainda que provenientes de única exposição (Coelho, 1970; Barbosa *et al.*, 1978; Miller e Wilson, 1978). Algumas características relevantes como aporte nutritivo abundante e estreitamento dos vasos sinusóides justificam o encontro dos esquistossômulos nesse local (Khammo *et al.*, 2002).

Aproximadamente no 28° dpi (dependente do modelo experimental), há maturação sexual e acasalamento dos parasitos, as fêmeas migram para as terminações das veias mesentéricas, devido à movimentos contracorrente e aos 35° dpi já se inicia a postura de cerca de 350 ovos ao dia. Com a postura das fêmeas, em média 50% dos ovos viáveis depositados nos vasos mesentéricos são eliminados nas fezes dos hospedeiros vertebrados, após reação inflamatória causada na submucosa e mucosa intestinal. Porém, o restante dos ovos pode retornar ao fígado pela veia porta e para vários outros órgãos; conforme há o desenvolvimento

dos miracídios, ocorrem secreção e excreção de substâncias reconhecidas pelo sistema imune como antígenos, causando reação inflamatória granulomatosa e fibrosa, com danos à saúde do hospedeiro (Miller e Wilson, 1978).

Há relatos de que a longevidade de *S. mansoni* pode ultrapassar três décadas em humanos infectados, como documentado sobre imigrantes poloneses que se refugiaram da segunda guerra mundial em países africanos; como um homem que viveu no Zimbábue durante cinco anos, Zâmbia por três meses e Tanzânia por um ano e nesse último local, o europeu costumava banhar-se numa coleção d'água rotineiramente. Após esse período mudou-se para a Austrália em janeiro de 1950. Nos anos 80, o homem foi internado com sinais de hepatoesplenomegalia, sangramento do reto que já perdurava há anos e icterícia; nas fezes foram encontrados ovos de *S. mansoni* 30,5 anos após sua saída do continente africano. Outro relato parecido com o primeiro é de um refugiado na Tanzânia no período de 1942 a 1950 e tinha costume de banhar-se em coleções d'água; decorrido oito anos mudou-se para a Austrália e após 31 anos, devido a complicações de saúde foi internado e de acordo com as suspeitas clínicas, ovos de *S. mansoni* foram visualizados nas fezes. Outro caso semelhante em refugiado que viveu em Uganda por oito anos e tinha contato direto e frequente com as águas do Lago Victória, o mesmo teve ovos do parasito identificados nas fezes 32,5 anos passados a sua mudança do país que lhe acolheu para o continente australiano (Harris; Russel e Charters, 1984).

1.4 Patogenia

Na derme, alguns minutos após a penetração da cercária, pode haver o desencadeamento de reações inflamatórias. No primeiro estágio tem-se liberação de moduladores histamínicos, com vasodilatação periférica local, conseqüente aumento de temperatura, vermelhidão, intumescência e prurido. Em aproximadamente 20 horas podem ser visualizadas a formação de pápulas, caracterizando dermatite cercariana (Cunha, 1970).

A forma aguda abrange as fases pré ou pós-postural com duração de 10 a 120 dias (Hyatt *et al.*, 1979). Os sinais clínicos da esquistossomose mansoni são variáveis, desde assintomáticos ou manifestações não patognomônicas e, até mesmo, quadros graves podendo levar o infectado a óbito. A princípio, entre 10 a 50 dias, alguns sintomas podem manifestar-se como hipertermia, cefaléia, tosse improdutiva, apatia, sensibilidade dolorosa abdominal, mialgia, hipertermia e hepatite aguda, causados possivelmente pela migração e destruição de

esquistossômulos no organismo, característica da fase pré-postural (Hyatt *et al.*, 1979; Van der Werf *et al.*, 2003).

Com o início da oviposição nos vasos mesentéricos (fase pós-postural), há desenvolvimento dos miracídios, conseqüente secreção/ excreção de antígenos, causa de lesões e formação de granulomas (Hams *et al.*, 2013; Chuah *et al.*, 2014). Há reação inflamatória da parede intestinal e posterior eliminação fecal de cerca da metade dos ovos viáveis. Porém, o restante dos ovos encontrados nos vasos mesentéricos pode ficar retido na parede intestinal ou serem disseminados via sanguínea para outros órgãos, como o fígado e pulmões, com formação de granulomas simultâneos de aspecto exsudativo, infiltrado eosinofílico, periferia pouco delimitada e necrose ou calcificação central. O final da fase aguda, geralmente se dá após 120 dias da infecção (Prata e Coura, 2008).

Existem poucos trabalhos sobre infecção por *S. mansoni* em ovinos. Adam e Magzoub (1976) infectaram duas ovelhas e constataram nos vasos mesentéricos e na submucosa intestinal infiltrado inflamatório próximo aos ovos que estavam inférteis ou calcificados. No fígado houve formação de granulomas decorrentes da deposição de ovos, além de neovascularização.

Em outros estudos experimentais como descrito por Modena (1989), foi observado após a infecção de bezerros, elementos lesivos no fígado, com substituição do parênquima por reação granulomatosa local em volta dos ovos, vasculite e fibrose portal, infiltrado mononuclear e eosinofílico em torno do parasito adulto. Nos vasos mesentéricos foram encontrados parasitos adultos, granulomas envolvendo os ovos; nos pulmões foi observado infiltrado eosinofílico circundando um helminto, além de granulomas. Esses estudos comprovam patogênese semelhante à encontrada na esquistossomose mansoni humana.

Na esquistossomose mansoni humana, a fase crônica é bem descrita e se caracteriza pela formação de granulomas perivasculares isolados no fígado e regiões de fibrose tecidual que circundam ovos e parasitos, como forma leve e caráter cicatrizante. A maioria desses granulomas tem formação nas ramificações dos vasos mesentéricos e não no espaço periportal como ocorre nas formas clínicas graves da fase aguda pós-postural (Cunha, 1970).

Porém, existe a forma grave hepatoesplênica, que ocorre devido à fibrose hepática decorrente da deposição dos ovos e reação imunológica, com granulomas e desestruturação vascular, causando hipertensão portal, neovascularização compensatória (*shunts* portossistêmicos), esplenomegalia com conseqüente disseminação dos ovos para outros tecidos (Prata e Coura, 2008).

Ainda que ocorra desestruturação do sistema porta hepático, há preservação do parênquima, denominando-se *pipestem*, descrita e documentada por Symmers (1904) in Cunha (1970).

1.5 Diagnóstico

As primeiras formas de diagnóstico de infecções por *S. mansoni* eram constituídas por métodos parasitológicos simples diretos, como utilização de amostra fecal em lâminas e analisadas ao microscópio óptico para observação dos ovos (Martins, 1937), porém, com baixa sensibilidade; além do encontro de parasitos e ovos nos vasos mesentéricos e granulomas, respectivamente, em exames *post mortem*.

Atualmente, o diagnóstico envolve distintas metodologias, como métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares de extrema importância para determinar ações em controle numa determinada região, além de contribuir com análises epidemiológicas, carga parasitária, programas em prevenção e tratamento das populações infectadas.

1.5.1 Métodos Parasitológicos

Algumas das primeiras técnicas de diagnóstico parasitológico para detectar infecção por *S. mansoni* constituem em preparação de lâminas e visualização ao microscópio óptico com amostras fecais, conforme técnica de sedimentação desenvolvida por Martins (1937), técnicas para flutuação dos ovos (Faust *et al.*, 1939) e métodos de centrifugação (Sapero e Lawless, 1953). Porém, devido à baixa sensibilidade, esses métodos entraram em desuso.

Com o avanço das ferramentas para diagnóstico, outras técnicas foram desenvolvidas, como a técnica de Kato modificada por Katz. Além dos ovos de *S. mansoni*, essa técnica pode ser utilizada para ovos de outros helmintos, sendo considerado um método qualitativo e quantitativo (Katz, Chaves e Pellegrino, 1972) e de escolha pela World Health Organization, para esquistossomose mansoni aplicado em vários países, principalmente em regiões endêmicas (WHO, 1994).

Outro método utilizado é o de eclosão dos miracídios. Nessa fase evolutiva o parasito apresenta fototropismo positivo. O teste diagnóstico consiste em colocar amostra fecal em balão volumétrico e completar com água desclorada. O frasco é iluminado por fonte de luz incandescente. Os miracídios eclodem e realizam movimentos natatórios em direção à superfície (ápice). O líquido pode ser coletado e quantificado com utilização de lugol e microscópio óptico (Chaia *et al.*, 1968). Esse método foi aprimorado por Jurberg *et al.*, (2008)

e consiste em frasco de *Erlenmeyer*, com pequeno tubo de comunicação acoplado a um coletor na porção superior. O frasco após receber amostra fecal é preenchido com água e colocado numa caixa de madeira, com apenas o coletor exposto à luz através de um orifício.

A raspagem de mucosa retal consiste em coleta de mucosa intestinal para visualização de ovos espiculados presentes em hospedeiros infectados. Primeiramente, a técnica foi aperfeiçoada por Prata (1957) in Cunha (1970) e adaptada por Pellegrino *et al.* (1965) com auxílio de uma cureta com concha pequena para coleta de material em primatas da espécie *Cebus* sp. infectados por *S. mansoni* e *S. japonicum* como forma de analisar a eficácia na terapêutica experimental. Posteriormente, Modena (1989) adaptou a técnica com a utilização da curetagem ou raspagem de mucosa retal em bovinos infectados experimentalmente por *S. mansoni*, com resultados satisfatórios.

1.5.2 Imunodiagnóstico

Os métodos imunológicos são utilizados na maioria das vezes como complemento de diagnóstico e de grande relevância em áreas de baixa endemicidade, com baixa carga parasitária, onde os métodos parasitológicos para visualização de ovos tornam-se menos sensíveis (Rey, 2001).

Um dos diagnósticos imunológicos mais difundidos e utilizados atualmente é o ensaio imunoenzimático- ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) que detecta anticorpos anti-*S. mansoni* circulantes (Van Weemen e Schuurs, 1971), sendo de alta sensibilidade, porém, como já descrito, não comprova o parasitismo e a especificidade depende do antígeno utilizado (Rabello *et al.*, 2008).

Outro exemplo de diagnóstico é a detecção de antígenos circulantes, como o método ELISA de captura, com uso de anticorpos para epítomos repetitivos. O método permite a diferenciação de infecções antigas e recentes, pois o resultado do teste está diretamente relacionado com a quantidade de antígenos circulantes, ou seja, com a carga parasitária (Doenhoff, Chiodini e Hamilton, 2004). Além disso, apresenta alta especificidade, dependente da presença do parasito para que existam antígenos circulantes. Após o tratamento há diminuição gradativa, até o desaparecimento dos mesmos na corrente sanguínea (aproximadamente seis semanas). Todavia, o diagnóstico tem deficiências na sensibilidade, principalmente em áreas de baixa endemicidade.

A técnica *Circulating Catodic Antigen* (CCA), utiliza antígeno circulante polissacarídeo conhecido como antígeno “M” presente no intestino do parasito adulto. O

dipstick utiliza anticorpo monoclonal para uma das porções glicídicas do CCA e promove a detecção antigênica na urina, considerado um teste rápido e de fácil operação (Vam Dam *et al.*, 2004). Entretanto, os epítomos são compartilhados com outros parasitos, microorganismos e até mesmo, células humanas, diminuindo a especificidade, com risco de resultados falso-positivos decorrentes de reações cruzadas (Shane *et al.*, 2011).

Para a eficácia dos métodos imunológicos, é imprescindível a obtenção de antígenos com propriedades seguras, como estabilidade e potencial antigênico, baixo custo de produção, estocagem, tempo de vida útil e fácil operação (Rabello *et al.*, 2008).

1.5.3 Métodos moleculares

A Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) amplifica sequências de DNA de *S. mansoni*, obtendo cópias em grande número (Saiki *et al.*, 1985) e de forma específica com pequena amostra, sendo importante em quadros de baixo parasitismo. No estudo desenvolvido por Oliveira *et al.* (2010) em pacientes infectados com *S. mansoni*, porém, com baixa carga parasitária, determinou especificidade de 100% nos pacientes diagnosticados e a sensibilidade na população estudada foi de 91%.

Os fatores limitantes da técnica PCR estão relacionados à contaminação que pode ser monitorada através de controles negativos, assim como controle dos equipamentos e reagentes a serem utilizados no teste, além do alto custo da reação (Rabello *et al.*, 2008).

1.6 A infecção em mamíferos não humanos

O primeiro relato da infecção natural por *S. mansoni* em mamíferos foi descrita em roedores no continente africano (Kunts, 1952). Em algumas partes do mundo, esses são os únicos a sustentarem o ciclo de transmissão entre os mesmos (Theron *et al.*, 2004).

No mundo, já foram relatados mamíferos infectados naturalmente da ordem Primata, Carnivora, Marsupialia, Artiodactyla e Rodentia (Amorim, 1953; Fenwick, 1969; Silva *et al.*, 1992; Coelho *et al.*, 1982; Modena, 1989; D'Andrea *et al.*, 2000; Gentile *et al.*, 2000; D'Andrea *et al.*, 2002).

Existem poucos estudos atualizados sobre a infecção de *S. mansoni* em animais domésticos. Karoum e Amin (1985) descreveram infecção natural em bovinos, cabras, ovelhas e canídeos numa área endêmica no Sudão, no continente africano. No Brasil, Barbosa *et al.* (1962), descreveram a infecção natural por *S. mansoni* em quatro bovinos, através de inspeção dos vasos mesentéricos e encontro da forma adulta do parasito. Ainda nesse estudo,

apenas um bovino apresentou curetagem retal positiva, porém, nenhum ovo viável. Em 1966, Piva e Barros, observaram ovos de *S. mansoni* presentes no fígado de bovinos adultos, acontecimento também reportado na Venezuela, ao qual, foi realizada a detecção de parasitos na veia porta de cinco fígados provenientes de bovinos em matadouros (Mayaudon e Power, 1970; Modena *et al.*, 2008).

Em 1982, Coelho *et al.*, descreveram a infecção experimental por via cutânea de bezerros por *S. mansoni*, que demonstraram desenvolvimento do parasito, ovos viáveis no fígado, mucosa intestinal e nas fezes, dos quais, eclodiram miracídios capazes de infectar moluscos da espécie *B. glabrata*, com produção de cercárias que infectaram camundongos, fechando-se assim, o ciclo parasitário.

No estudo realizado para levantamento epidemiológico de bovinos infectados por *S. mansoni*, foram feitas curetagens retais de 894 bezerros provenientes de áreas endêmicas para esquistossomose, no estado de Minas Gerais, Região Sudeste do Brasil, com eliminação de ovos viáveis em nove animais (Modena *et al.*, 1991).

Posterior experimento foi realizado em condições seminaturais, em que três bezerros infectados por *S. mansoni* foram colocados numa área de 2.500m² com cinco bezerros não infectados. No local foi construído um tanque hídrico de concreto e colocados 500 exemplares de *B. glabrata* sem infecção anterior. Como resultado, todos os bezerros controle se infectaram no período de 79 a 202 dias; os moluscos reproduziram e ao final do estudo já eram 3.304 exemplares, sendo a taxa de emergência das cercárias em 49% (Modena *et al.*, 1993).

Em ovinos, já foram realizados em todo mundo, apenas dois estudos sobre a infecção por *S. mansoni*. No estudo realizado por Saeed e Nelson (1974), quatro ovinos da raça Suffolk-Welsh-Border foram expostos à infecção experimental com 20.000 cercárias durante tempo estimado de trinta minutos. Após a 10^o semana de infecção foram detectados ovos nas fezes, em pequeno número e após a eutanásia dos animais, foram observados parasitos adultos nos vasos mesentéricos, além de lesões características da infecção foram observadas no tecido hepático.

Adam e Magzoub (1976) infectaram experimentalmente duas ovelhas nativas do deserto sudanês pela via cutânea com 1.500 cercárias de *S. mansoni* e um animal controle. Os ovinos demonstraram susceptibilidade à infecção. No 1^o animal foram recuperados 700 e no segundo 400 parasitos adultos. Os capilares mesentéricos e a submucosa intestinal apresentaram infiltrado inflamatório próximo aos ovos que estavam inférteis ou calcificados e

no fígado houve formação de granulomas decorrentes da deposição de ovos, além de neovascularização. Nos parasitos foram encontrados ovos no útero.

Ainda nesse estudo, os animais infectados demonstraram alterações clínicas no decorrer da infecção (Adam e Magzoub, 1976). Esses resultados demonstraram que mesmo não havendo evidências de contaminação ambiental por ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes dos ovinos, pode haver prejuízo econômico à produção animal, uma vez que lesões no fígado e intestino podem acarretar disfunções metabólicas e na digestão e absorção de nutrientes (Saeed e Nelson, 1974; Adam e Magzoub, 1976).

Adam e Magzoub (1977) infectaram dois caprinos de cinco a seis meses de idade e duas cabras de dois a três anos de idade foram infectados com 1.500 e 3.000 cercárias de *S. mansoni*, respectivamente. Como resultado da avaliação clínica, os cabritos jovens mostraram maior gravidade de sintomas e de forma mais precoce se comparado às cabras de maior idade; um dos filhotes apresentou aos 20 dpi tosse e corrimento nasal. Ambos desenvolveram anorexia e prostração aos 90 dpi, além de diarreia, redução de apetite, mucosas pálidas, esgotamento físico, perda progressiva da condição corporal dos 163 aos 199 dpi, queda de pelo e edema submandibular aos 210 dpi. Nesse experimento, ambos os filhotes não resistiram à infecção, morrendo aos 238 e 241 dpi. Entretanto, as cabras de dois a três anos de idade demonstraram sinais clínicos mais tardiamente, como redução de apetite aos 125 e 155 dpi, constipação em alternância com diarreia, redução de apetite, mucosas pálidas, aumento da silhueta abdominal, sensibilidade dolorosa à percussão torácica, aumento da frequência respiratória, corrimento nasal dos 200 aos 240 dpi. Próximo ao final do estudo (350 dpi) foi observado alopecia e hiperexcitabilidade nervosa ao ser pressionado o crânio dos animais, porém, nenhum dos adultos morreu em decorrência da infecção.

2. JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma doença causada por espécies do gênero *Schistosoma* que afeta 200 milhões de indivíduos em 74 países do mundo segundo a *World Health Organization* (WHO) (2004). O ser humano é o principal hospedeiro definitivo (Nelson, 1960). Porém, outros mamíferos podem ser infectados, como roedores, marsupiais, bovinos e ovinos (Modena *et al.*, 1993; Adam e Magzoub, 1976; Modena *et al.*, 2008).

Além disso, animais domésticos como cães, bovinos e ovinos demonstraram susceptibilidade à infecção por *S. mansoni* (Karoum e Amin, 1985). Em 1974, Saeed e Nelson infectaram ovinos e após a 10ª semana de infecção encontraram ovos viáveis nas fezes, utilizados para infecção de moluscos do gênero *Biomphalaria*, concluindo o ciclo em laboratório, posterior à infecção de camundongos. Adam e Magzoub (1976) infectaram experimentalmente duas ovelhas nativas do sul do deserto sudanês, recuperando inúmeros parasitos adultos e no fígado constataram granulomas em volta de ovos. No estudo não foram encontrados ovos nas fezes, mas as fêmeas demonstraram ovos no útero.

Ovinos da raça Santa Inês são adaptadas à Região Nordeste do Brasil, apresentam elevada rusticidade, menor exigência nutricional, acentuada habilidade materna, além de pouca estacionalidade reprodutiva e adaptabilidade aos ambientes de temperaturas elevadas como o semiárido, região de origem da mesma (Cunha *et al.*, 2008) e endêmica para esquistossomose mansoni (Katz e Peixoto, 2000).

Além disso, no Brasil, há demanda para expansão da pecuária, com desenvolvimento de novas formas de organização nos métodos de criação de animais, como bovinos e ovinos, exigindo maior densidade populacional em menor espaço, além da movimentação de rebanhos entre propriedades, o que pode ser um fator importante para a dispersão de agentes parasitários (Modena *et al.*, 2008).

Dessa forma, esse estudo se justifica a partir da importância pouco conhecida dos ovinos à susceptibilidade ao *S. mansoni*, que pode ter importância na ovinocultura no Brasil e epidemiologia da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar aspectos da infecção por *S. mansoni* (Sambon, 1907) em ovinos da raça Santa Inês.

3.2 Objetivos específicos

-Acompanhar clinicamente os ovinos infetados por *S. mansoni* com avaliações periódicas de 0 aos 255 dpi, de acordo com ficha clínica (Anexo 1);

-Observar perfil hematológico (Células vermelhas e brancas) dos ovinos controles e infectados durante o período experimental (0 a 255 dias);

-Avaliar o perfil sorológico dos animais durante todo o período de infecção, de acordo com a titulação do anticorpo IgG pelo método ELISA;

- Realizar o teste rápido de detecção de antígeno na urina (*Bilharzia- Schistosoma: For qualitative detection- Rapid Medical Diagnostics®*), nos intervalos de 165 e 255 dpi;

-Realizar exames parasitológicos de fezes e métodos de eclosão de miracídios para confirmar a eliminação de ovos nas fezes;

-Avaliar aspectos patológicos nos ovinos decorrentes da infecção com observação de lesões macroscópicas e microscópicas dos órgãos ao exame *post mortem*;

-Pesquisar ovos e parasitos de *S. mansoni* em tecidos como pulmão, fígado e intestinos delgado e grosso pela técnica de perfusão de vísceras (Coelho *et al.*, 1982) e método de digestão por KOH a 5% (Cheever, 1968).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 10 ovinos (*Ovis aries*) da raça Santa Inês, machos, castrados, com média de doze meses de idade, provenientes de propriedade rural indene para esquistossomose mansoni, sem presença de moluscos do gênero *Biomphalaria* sp. em suas coleções d'água, localizada no Município de Curvelo (latitude 18° 45' 23" S, longitude 44° 25' 51" W e altitude de 632 M), no estado Minas Gerais, Brasil. Os ovinos utilizados no presente estudo primeiramente foram selecionados de acordo com uniformidade quanto à idade, tamanho e sexo. Após o procedimento, foram separados aleatoriamente em dois grupos, sendo identificados por brincos numerados. Os animais do grupo Controle foram identificados com a seguinte numeração: 09, 21, 22, 26 e 29. Os ovinos do grupo Infectado por: 01, 03, 05, 06 e 07.

4.2 Infecção

4.2.1 Obtenção de cercárias

Para infecção, utilizou-se *Biomphalaria glabrata* infectadas por *S. mansoni*, mantidas no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) – Fiocruz Minas. Os moluscos foram transportados em caixas de isopor, envolvidos por gaze umedecida de forma a evitar traumas, extravasamento de hemolinfa e morte. Ao chegar à propriedade rural, os espécimes foram colocados em Becker com 500 ml de água desclorada (Figura 1 A), sobre estímulo luminoso de lâmpada incandescente de 60w para obtenção de cercárias (Figura 1 B). Após constatação visual da emergência de cercárias, foi coletado com pipeta 200 µl da solução, colocada em placa, corada com lugol e quantificados os parasitos com uso de microscópio estereoscópico. Esse processo foi feito a cada 5 minutos, até a quantidade ideal estimada de parasitos para infecção dos ovinos, ou seja, média de 350 cercárias/ml como demonstrado na Figura 1 (C e D).

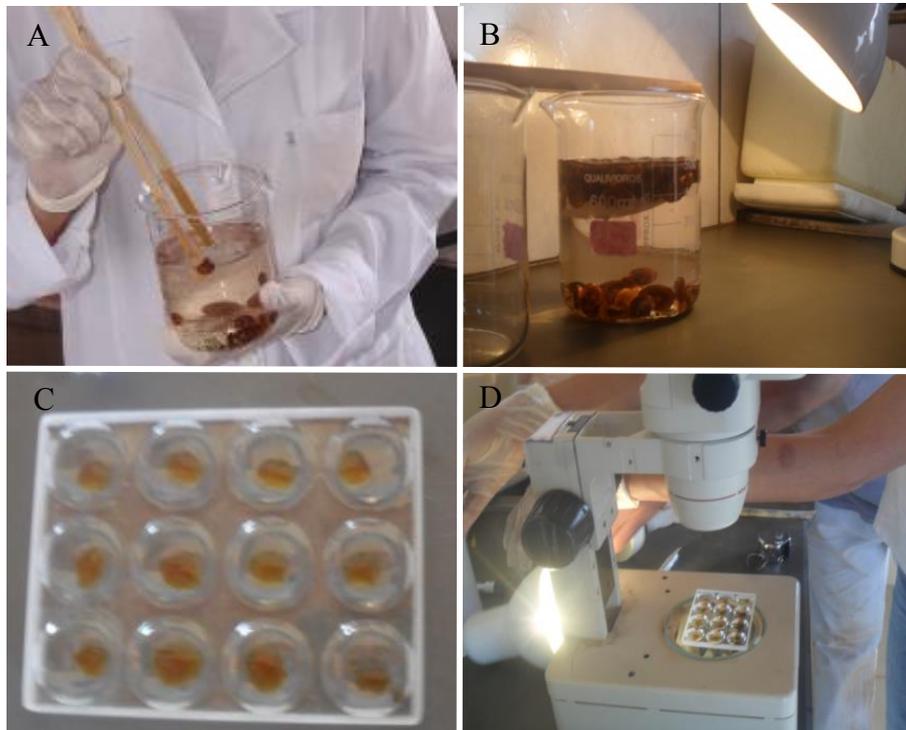


Figura 1: Procedimento para obtenção e quantificação de cercárias de *Schistosoma mansoni*. A- espécimes de *Biomphalaria glabrata* colocadas em Becker com 500ml de água desclorada. B- exposição dos moluscos infectados à luz para estímulo à emergência de cercárias. C e D- após constatar visualmente a forma infectante, 200 µl da solução foi colocada em placa, corada com lugol e quantificada.

4.2.2 Infecção por via cutânea

Os animais foram sedados com xilazina (0,1 mg/kg/intramuscular) e quetamina (2 mg/kg/endovenoso), colocados em decúbito dorsal após a perda de consciência, do tônus muscular e realizada imobilização dos membros com cordas (Figura 2 A). A região inguinal foi o local escolhido para a aspersão de cercárias, a qual foi limpa com água desclorada e secada com papel toalha. A exposição às cercárias ocorreu por via cutânea, na região inguinal com aproximadamente 2.000 cercárias de *S.mansoni* aspiradas com pipeta graduada e gotejada no local, como a técnica descrita por Coelho *et al.*, (1982) (Figura 2 B). O tempo de exposição à forma infectante foi de 60 minutos, decorrido o intervalo, na região de contato com inóculo infectante foi aspergido álcool 70% (região inguinal) para matar as cercárias que não penetraram no tegumento (Figura 2 C).

Durante todo o procedimento foram avaliados os padrões vitais, como frequência cardíaca, respiratória, movimentos ruminais, pulso e reflexos, para que nenhuma complicação pudesse comprometer o bem estar físico e psicológico dos ovinos durante o procedimento.

Após a infecção e retorno anestésico, os ovinos foram alocados em pastejo extensivo junto ao restante do rebanho em piquete massai, recebendo suplemento nutritivo duas vezes ao dia em cochos, como silagem de milho, silagem de cevada, caroço de algodão, cana moída e sal mineral, além de pastejo contínuo (Figura 2 D).



Figura 2: Infecção experimental de ovinos da raça Santa Inês por *Schistosoma mansoni*. Foto A- ovinos anestesiados com perda da consciência e do tônus muscular posicionados em decúbito dorsal. Foto B- local de gotejamento da solução de água desclorada contendo cercárias. Foto C- inóculo retido na região inguinal de ovino. Foto D- Ovinos após o retorno anestésico.

4.3 Parâmetros clínicos

4.3.1 Avaliação clínica

Os intervalos neste estudo foram realizados quinzenalmente do dia zero até 75 dpi. A partir desse período, a avaliação foi realizada mensalmente até 255 dpi, totalizando ao final do experimento doze intervalos (0, 15, 30, 45, 60, 75, 105, 135, 165, 195, 225, 255 dias).

Ao preceder o exame clínico, os ovinos controles e infectados eram realocados em baia coletiva. À princípio, constatou-se que a manipulação dos animais causou grande estresse com aumento da frequência cardíaca e respiratória, com minimização do estresse causado, ao realizar o exame clínico e restrição em espaço no curral durante a noite com água e alimento *ad libitum*. No dia seguinte, por volta das 8 hr, os animais eram realocados para a baia e após uma hora, realizados o exame clínico, coleta de sangue e, por último a pesagem dos animais infectados e controles. Dos animais infectados e controles foram avaliados aspectos relacionados ao sistema cardiovascular, digestório, respiratório e hepático, assim como padrões de condição corporal e análise da coloração de mucosa pelo método Famacha © (Bath e Van Wyk, 2001). Essa metodologia foi criada no estudo realizado por Bath, Malan e Van Wyk (1996), ao qual, há correlação dos valores de hematócrito e diferenças no grau de tonalidades no preenchimento capilar sanguíneo, na conjuntiva ocular de ovinos. A metodologia Famacha © atualmente é utilizada para avaliar indiretamente a necessidade do uso de anti-helmínticos em pequenos ruminantes, visto que alguns helmintos como *Haemonchus* sp. podem levar a quadros de anemia grave pela espoliação e perda sanguínea e, conseqüentemente, diminuição do preenchimento dos capilares da conjuntiva ocular e palidez da mucosa.

4.3.2 Perfil hematológico

4.3.2.1 Coleta de sangue

As amostras foram coletadas nos intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 75, 105, 135, 165, 195, 225 e 255 dias, totalizando 12 coletas para avaliação do perfil de células vermelhas e parâmetros imunológicos.

A coleta de sangue dos ovinos controles e infectados ocorreu pela punção da veia jugular externa, após assepsia local com gaze e álcool 70%, com uso de seringa de polipropileno (5 ml) e agulha (27mmx8mm- 22Gx1). Em seguida, o sangue era transferido para tubos, com anticoagulante EDTA (*Ethilenediamine Tetraacetic Acid*) e homogeneizadas dez vezes para evitar coagulação. Os tubos previamente identificados eram acondicionados

em caixa de isopor contendo gelo e transportados para o Laboratório de Helminologia Veterinária, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

O sangue coletado foi dividido da seguinte forma: 1ml de sangue para realização do hemograma e esfregaço sanguíneo e 3ml centrifugados por 10 minutos a 200g para obtenção de plasma. O plasma foi dividido em cinco alíquotas/amostra e acondicionado em freezer a -20°C, para posterior realização da cinética de IgG sérica.

4.3.2.2 Perfil de células vermelhas

As amostras foram utilizadas para a detecção dos valores de hemácias, hematócrito, volume globular médio, hemoglobina e plaquetas, sendo as duas primeiras variáveis realizadas como descrito por Ferreira Neto, Viana e Magalhães (1982) e as variáveis, de hematócrito, hemoglobina, volume globular médio e plaquetas de forma automatizada pelo aparelho hematológico veterinário (*Bio2900 Vet- Bioeasy*®).

Para a quantificação de hemácias, a amostra sanguínea contida em tubos com anticoagulante EDTA foi homogeneizada e transferido 1µl, com uma pipeta automática para 200µl de solução salina a 0,85% (diluição de 1:200) em tubo de *Eppendorf*. Após homogeneização da solução, 50 µl foi colocada em câmara de *Neubauer*.

Posterior ao processo foi quantificado cinco quadrados médios do grande quadrante central na câmara, com soma dos valores obtidos em cada quadrante multiplicado por 10.000, com resultado em hemácias por mm³ de sangue. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e obtida média final para cada ovino.

4.4 Parâmetros imunológicos

4.4.1 Contagem total de leucócitos

Os intervalos para a análise de leucócitos seguem como descrito no perfil de células vermelhas.

Conforme descrito por Ferreira Neto, Viana e Magalhães (1982), a amostra sanguínea contida em tubos com anticoagulante EDTA foi homogeneizada e transferidos 10µl para 200µl de solução de *Turk* (diluição de 1:20) em tubo de *Eppendorf* para lise dos eritrócitos e coloração das células leucocitárias por violeta genciana.

Para quantificação dos leucócitos foi utilizada câmara de *Neubauer*, com contagem das células nos quatro quadrantes laterais. O valor obtido foi multiplicado por 50 e o resultado

demonstra o número de leucócitos por mm³ de sangue. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e obtidas médias finais para cada ovino controle e infectado.

4.4.2 Contagem diferencial de leucócitos

Para acompanhar variações em células leucocitárias dos ovinos infectados em comparação com o grupo controle, foram realizados esfregaços sanguíneos após a coleta de sangue segundo a técnica de Ferreira Neto, Viana e Magalhães, (1982).

Os esfregaços foram confeccionados em duplicata, corados pelo método de panótipo rápido e as células diferenciadas em microscópio óptico utilizando a objetiva de imersão. Em cada lâmina foram contadas e identificadas 200 células leucocitárias, e, ao final, obteve-se a porcentagem de cada tipo celular encontrado, como neutrófilos, neutrófilos bastonetes, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, baseada em aspectos morfológicos.

4.4.3 Imunoglobulina G sérica

A técnica de ELISA foi padronizada para a espécie ovina no Laboratório de Referência em Esquistossomose- Centro de Pesquisas René Rachou- Fundação Oswaldo Cruz- Belo Horizonte- Minas Gerais, como descrito a seguir:

O antígeno proteico utilizado foi obtido de parasitos adultos de *S. mansoni* (SWAP- *Soluble Worms Adult Antigen*), provenientes de camundongos infectados experimentalmente, preparado de acordo com Colley *et al.*, (1977) e a concentração proteica foi estimada pela técnica de Lowry *et al.*, (1951) em 2,95µg/µl. Ambos os procedimentos já haviam sido realizados anteriormente e a solução antigênica permaneceu estocada em congelador a -20°C.

Para a sensibilização da placa com 96 poços, 3,4µl da solução antigênica foi diluída em 10 ml de Tampão Bicarbonato/Carbonato (TBC). Em cada poço foram colocados 100µl da solução final, sendo a primeira coluna da placa utilizada como padrão branco e as duas últimas como controles negativos. A placa permaneceu em *over night* em refrigerador a 4°C durante 12 horas.

Após o processo de sensibilização da placa de 96 poços, a mesma foi lavada cinco vezes com *Phosphate Buffered Saline-Tween* (*Phosphate Buffered Saline* diluído 1X em ph a 7,20 e acréscimo de 500 µl de *Tween 20*- PBS T20).

Na próxima etapa foi feita diluição a 2,5% de leite em pó *Molico* (1,25Gr/ 50 ml PBS T20) e colocado 300 µl da solução/poço. A placa foi mantida em estufa a 37°C durante 60 minutos, destampada. Decorrido o tempo, a placa foi lavada cinco vezes em PBS T20.

A diluição do plasma dos ovinos infectados e controles nos intervalos já mencionados, foi padronizado em 1:200 e 1:400 com PBS 1X sem *Tween*, colocado 100 µl da solução/poço e mantida em temperatura ambiente durante 60 minutos. Ao final dessa etapa a placa foi lavada cinco vezes em PBS T20.

Como conjugado, foi preconizado o uso de Anti IgG de ovino associado à peroxidase (*Sigma*), na diluição de 1 µl em 30ml de PBS T20 (1:30.000). Após o procedimento, foi colocado 100 µl de solução/poço e passados 60 minutos com a placa mantida em temperatura ambiente, a mesma foi lavada cinco vezes com PBS T20.

Para sinalização da reação foi utilizado o *Tetramethylbenzidine (Sigma)* (TMB) na quantidade de 100 µl/poço durante 15 minutos em local com baixa luminosidade e, decorrido o tempo, cada poço recebeu 50 µl de solução de parada da reação.

A leitura da reação foi realizada no leitor de ELISA, com comprimentos de onda de 450 nm e a coluna branca subtraída. Cada teste foi realizado em duplicata e com os resultados, foi realizada uma média final de cada reação.

4.5 Parâmetros parasitológicos

4.5.1 Exame parasitológico de fezes

Foram coletadas amostras fecais dos animais infectados por via retal para avaliação da presença de ovos a partir de 50 dpi (50, 65, 80, 95, 110, 140, 170, 200, 230 e 255 dpi). As amostras fecais foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo para manter a temperatura em até 10°C nas saídas a campo, transportadas para o Laboratório de Helminologia Veterinária (ICB-UFMG).

Á princípio a técnica utilizada para visualização dos ovos seria a de sedimentação espontânea (Hoffman, Pons e Janer), com processo de retirada do sobrenadante para limpeza da amostra durante três ciclos, utilizando água resfriada a 4°C de forma e evitar a eclosão dos miracídios.

4.5.2 Método de eclosão de miracídios

Em função de que o miracídio de *S. mansoni* possui forte fototropismo positivo, foram realizadas duas técnicas de eclosão a partir de 50 até 255 dpi, com intervalos quinzenais até aos 110 dpi e mensal até aos 255 dpi durante o experimento (50, 65, 80, 95, 110, 140, 170, 200, 230 e 255 dpi).

A primeira técnica foi descrita por Chaia *et al.* (1968). Duas gramas de fezes foram colocadas em balão volumétrico envolvido até 2/3 do ápice por folha metálica, preenchido por água desclorada e colocado sobre a luminosidade proveniente de lâmpada incandescente. A solução foi monitorada a cada 30 minutos visualmente, durante seis horas, com coleta do sobrenadante e análise em microscópio óptico para encontro de miracídios (Figura 3 A).

O segundo método utilizado foi descrito por Jurberg *et al.* (2008). Consiste em frasco de Erlenmeyer, localizado dentro de uma caixa de madeira vedada à entrada de luminosidade, com coletor exteriorizado na porção superior, local de concentração dos miracídios devido ao fototropismo. O frasco recebeu amostra fecal (2gr/amostra), foi preenchido por água desclorada a temperatura ambiente até ¾ do coletor externo e monitorado conforme o método descrito anteriormente (Figura 3 B).



Figura 3: Métodos de eclosão de miracídios de *Schistosoma mansoni*. A- Método de Chaia *et al.* (1968)- balão volumétrico envolvido com folha alumínio, contendo solução com água desclorada e amostra fecal exposta à luz. B- Método de Jurberg *et al.*, (2008)- frasco dentro da caixa de madeira vedado à luz com apenas um canal de comunicação entre o meio interno onde se encontra a solução de água desclorada e amostra fecal e o meio externo onde encontra-se estrutura coletora de miracídios.

4.5.3 Curetagem de mucosa retal

Nos intervalos de 60, 70, 75, 105, 135, 165 aos 255 dpi, foi realizada curetagem de mucosa retal nos ovinos infectados, com uso de cureta metálica com borda cortante adaptada ao final, como observado na Figura 4 A. Para a obtenção de mucosa sem detritos fecais, foram

retiradas as fezes encontradas no reto dos ovinos, e cada amostra fecal acondicionada a 10°C. Após o procedimento, a cureta foi introduzida na ampola retal dos animais por aproximadamente 10 cm, com rápido movimento retrógrado (Figura 4 B) e obtenção de mucosa com média de 2 cm de comprimento por 0,5 cm de largura (Figura 4 C e D). As amostras foram acondicionadas em salina resfriada (4°C) e examinadas após compressão entre lâmina e lamínula no microscópio óptico no aumento de 10 e 40X (Coelho *et al.*, 1982; Modena, 1989) no laboratório de Helmintologia Veterinária (ICB-UFMG).

Os ovos encontrados foram avaliados quanto à viabilidade e ao estágio de desenvolvimento como descrito por Pellegrino *et al.* (1965).



Figura 4: Método de curetagem de mucosa retal em ovinos infectados por *Schistosoma mansoni*. Foto A- Materiais para procedimento. B- Procedimento de curetagem. C e D- Mucosa obtida com salina acondicionada em frasco identificado.

4.5.4 Detecção de antígeno na urina

Para detecção da infecção por *S. mansoni*, foram realizados exames nos animais infectados e controles com o teste rápido *Bilharzia (Schistosoma) (For qualitative detection)* do laboratório *Rapid Medical Diagnostics®* (Figura 5 C). O teste tem como princípio a detecção de um polissacarídeo (*circulating catodic antigen-CCA*), conhecido como antígeno “M”, presente no intestino do parasito e encontrado na urina de humanos infectados (Ayele *et al.*, 2008).

Para coleta de urina por micção natural, a região abdominal dos ovinos foi limpa com gaze em água desclorada e seca com papel toalha. Posterior à limpeza foi colocado recipiente acoplado na região peniana dos ovinos sustentados por elástico na circunferência abdominal, buscando-se o mínimo desconforto para os animais (Figura 5 A e B). Após a coleta a campo, as amostras foram congeladas a -20°C por 24 horas. Os exames foram realizados no Laboratório de Helmintologia Veterinária- ICB- UFMG, em duplicata, com a urina descongelada em temperatura ambiente. O teste procedeu da seguinte forma: com pipeta própria do kit a urina foi aspirada do recipiente de acondicionamento e gotejada no orifício circular localizado na borda do cassete; após observar a absorção completa da urina pelo papel filtro do teste, colocou-se uma gota da solução tampão (Figura 5 D). As amostras foram deixadas em repouso por 20 minutos e decorrido esse tempo, classificadas quanto positivas ou negativas até aos 25 minutos, como preconizado pelo fabricante do kit (*Rapid Medical Diagnostics*).

O teste foi realizado em dois intervalos, aos 135 dpi e 255 dpi nos ovinos infectados e controles.

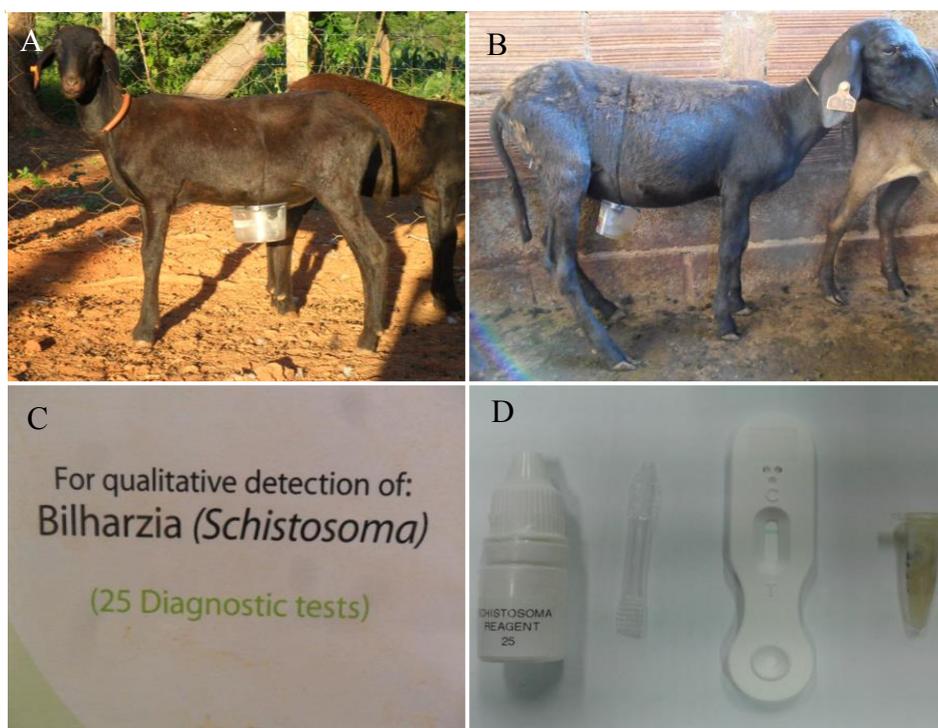


Figura 5: Metodologia para coleta de amostra e diagnóstico de antígeno de *Schistosoma mansoni* em ovinos. A- Recipiente acoplado na região peniana, sustentado com elástico a envolver circunferência abdominal. B- Urina retida em frasco após micção natural de ovino. C- Kit para detecção antigênica. D- Materiais e amostra a ser utilizada.

4.5.2 Avaliação *post mortem*

4.5.2.1 Aspectos patológicos

Os animais foram eutanasiados de acordo com o Conselho Federal de Medicina Veterinária (2012) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2015) e necropsiados segundo a técnica de Coelho *et al.* (1982) nos seguintes intervalos de infecção: um animal foi sacrificado aos 135 dpi e três animais aos 255 dpi. Os órgãos foram avaliados para visualização de lesões macroscópicas. Todavia, o ovino 05 veio a morrer de causas naturais na propriedade rural, com congelamento das vísceras, o que impossibilitou o exame macroscópico e microscópico dos órgãos, assim como a recuperação de parasitos pela técnica de perfusão.

O intestino foi medido por fita métrica e órgãos como pulmão e fígado foram pesados.

Após a necropsia, foram coletados fragmentos com aproximadamente 0,5 cm³ dos órgãos: intestino, pulmão, fígado, baço e linfonodos, fixados em formol a 10% tamponado, desidratados, diafanizados, incluídos em parafina, cortados a três micrômetros, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (Luna, 1968) e examinados ao microscópio óptico para determinar as características das lesões.

4.5.2.2 Recuperação de *Schistosoma mansoni* em órgãos

Após a necropsia dos espécimes de ovinos infectados e retirada das vísceras, foi realizada a perfusão com solução salina (0,85%), injetada na veia porta no fígado e vasos mesentéricos com tubos de polipropileno, técnica anteriormente descrita por Coelho *et al.* (1982). Aproximadamente 5 litros de solução foram necessários para perfusão. Após o processo, o líquido foi colocado em recipientes para sedimentação, para posterior análise em microscópio estereoscópico, visualização e quantificação de *S. mansoni*.

Os parasitos encontrados foram colocados em solução formol a 10%, identificados quanto ao gênero, quantificados, corados com ácido acético e medidos.

4.5.2.3 Recuperação de ovos de *Schistosoma mansoni* em órgãos

Fragmentos de órgãos, como fígado, intestinos delgado e grosso foram digeridos por hidróxido de potássio a 5% (KOH), como descrito por Cheever (1968).

Como padronização da quantidade de hidróxido de potássio a 5% necessária para digestão de tecido hepático e intestinal de ovinos, foi preconizado 150 ml da solução para cada 50 gr de fígado, seccionado a 1 cm³ e 250 ml da solução de KOH para 50 gr de intestino

seccionado a 2 cm de comprimento, o último, dividido em parte proximal, média e final. O material foi acondicionado em frascos plásticos, colocados em estufa a 37°C durante oito horas.

Após o procedimento, a solução com líquido digerido foi alocada em Becker com 500 ml de água para sedimentação e limpeza do material. Após 60 minutos, foram retirados 300 ml, repetindo o processo por cinco vezes até que o líquido presente estivesse limpo (Figura 6 A-H). O sedimento foi colocado em tubos Falcon para nova sedimentação, análise em microscópio óptico (aumento 10 e 20x) e quantificação dos ovos de *S. mansoni*.

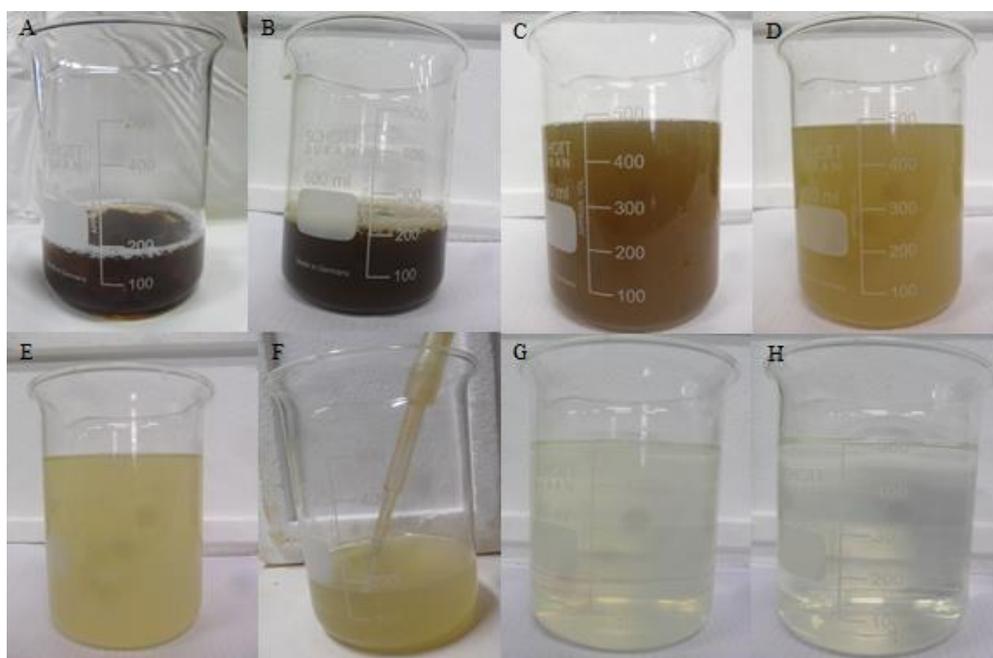


Figura 6: Digestão de fígado de ovino infectado experimentalmente por via cutânea com *Schistosoma mansoni*. A- Fragmentos do órgão com 1cm³ e peso final de 50 gr acrescido de 150 ml de hidróxido de potássio a 5%. B- Fragmentos digeridos após o processo em estufa a 37°C durante oito horas em frasco com 30cm de circunferência e transferido para *Becker*. C, D, E, F, G- processo de limpeza do material e retirada do sobrenadante durante cinco ciclos. H- Líquido limpo após as lavagens com sedimento.

4.6 Delineamento estatístico

Os testes estatísticos utilizados no estudo foram realizados pelo programa *GraphPad Prism 5.0* ®. Os dados foram analisados quanto à normalidade e comparação entre os dois grupos estudados (controle e infectados) pelo teste *Two-way Anova*, com nível de significância de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

4.7 Considerações éticas

Foram realizadas todas as atividades descritas respaldadas nos princípios do bem estar animal de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2015) e a eutanásia realizada segundo as orientações do Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais – Conceitos e Procedimentos Recomendados – Conselho Federal de Medicina Veterinária (2012) e ao Comitê de Ética em Experimentação Animal- UFMG sob o número de protocolo 15/2016.

5. Resultados

5.1 Infecção

Durante o período de exposição dos ovinos ao inóculo de cercárias, notou-se que cerca de 20 minutos após o início do procedimento, houve escorrimento de parte da solução nos animais 03, 05 e 06. Após 30 minutos de exposição, o mesmo evento foi observado no ovino 01 e o ovino 07 permaneceu com o inóculo infectante até 50 minutos, quando parte escorreu para a região abdominal, mas em todos os animais, mesmo com o escorrimento, o líquido permaneceu em contato com a pele.

5.2 Parâmetros clínicos

5.2.1 Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada nos ovinos controles e infectados durante todo o período experimental (0, 15, 30, 45, 60, 75, 105, 135, 165, 195, 225 e 255 dias). O ovino 05 morreu aos 53 dpi, conseqüente à lesão medular nas vertebrae lombares resultado de acidente. Dessa forma, não foi possível realizar todos os intervalos propostos para a avaliação clínica, assim como os demais os demais objetivos, como abordados mais adiante.

Os resultados do acompanhamento da coloração de mucosa foram realizados de acordo com o método Famacha[®] e está apresentado no Gráfico 1. O desvio padrão médio de cada grupo é observado como barras verticais. Nesses tópicos não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos Controle e Infectado ($p > 0,05$).

No Gráfico 2 estão representados os resultados referentes ao peso médio dos grupos de ovinos controles e infectados. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação dos grupos durante os intervalos de 30 ($p < 0,01$) e 60 dpi ($p < 0,05$), com redução de peso nos ovinos infectados. A média de peso no grupo de ovinos controles no período de 30 dpi foi de 23.5 kg e no grupo infetado de 16.80 kg, com menor peso o ovino 03 (15,5 kg) e maior peso

no ovino 05 (19kg). A diferença na comparação entre grupo infectado e controle aos 30 dpi foi de 6,7kg. Aos 60 dpi, a média de peso do grupo controle foi de 23,75kg e o grupo infectado de 18,13kg; os animais infectados de menor peso nesse intervalo foram os ovinos 03 e 06, ambos com 17kg e o de maior peso o ovino 07 com 20 kg (Quadro 1). Entretanto, ressalta-se que o grupo infectado apresentou perda de peso durante os primeiros 75 dias de experimento, com exceção ao dia 15, com ganho de peso compensatório a partir de 105 dpi.

A avaliação de escore corporal está apresentada no Gráfico 3, bem como o desvio padrão médio de cada grupo. Foi observada no período estudado, diferença estatisticamente significativa aos 60 dpi, com redução do escore corporal no grupo de ovinos infectados ($p < 0,05$). Entretanto, aos 15 até os 165 dpi o escore corporal foi menor no grupo infectado.

A análise de frequência cardíaca por minuto (FC/mim), frequência de movimentos respiratórios por minuto (FR/min) e temperatura retal (TR) estão representados nos Gráficos 4, 5 e 6, respectivamente. Observa-se que as variáveis têm no dia 0 valores superiores nos dois grupos se comparado ao restante do período.

A pelagem dos ovinos se mostrou normal durante todo o estudo, sem áreas de alopecia ou quebra dos fios.

No que se refere ao abdome, não houve diferença no contorno da silhueta, durante todo o período acompanhado (dia 0 aos 255 dpi). Quanto à sensibilidade dolorosa à palpação abdominal, apenas o ovino 03 apresentou o quadro aos 45 dpi. Todavia, o fígado dos ovinos, durante o experimento não se mostrou palpável.

Quanto ao sistema respiratório, à auscultação pulmonar não foi observada presença de estertores ou congestão do órgão. No sistema respiratório superior, à percussão de seios nasais e paranasais não foi observado congestão por excesso de secreções e sensibilidade dolorosa. Porém, foi constatada secreção nasal mucosa bilateral aos 60, 135, 255 dpi em ambos os grupos, provavelmente devido ao tempo seco e à poeira aspirada, comum à região durante o período seco do outono e inverno.

Quanto ao aspecto de fezes amorfas e a presença de excesso de muco, as alterações foram demonstradas nos intervalos 30 dpi em três animais infectados (ovinos 01, 03 e 06) e um controle, aos 75 (ovino 01 e 07) e 135 dpi (ovino 03 e 07) em dois animais infectados e um controle.

Quadro 1: Variação do peso médio de ovinos da raça Santa Inês, controles e infectados por *Schistosoma mansoni* durante o período de experimento.

Peso dos ovinos/Kg				
Intervalo Dias pós-infecção	Peso médio Controle	Controle Comparação ao dia 0	Peso médio Infectado	Infectado Comparação ao dia 0
0	23	-	21,20	-
15	22,3	-0,7	22	0,8
30	23,5	0,5	16,80	-4,4*
45	22,75	-0,25	19,70	-1,5
60	23,75	0,75	18,13	-3,07*
75	24,25	1,25	19,88	-1,32
105	25,25	2,25	22	0,8
135	23,2	0,2	22,63	1,43
165	24	1	22,50	1,3
195	25	2	23,33	2,13
225	26,5	3,5	24,50	3,3
255	30,5	7,5	28,67	7,47

* Diferença estatisticamente significativa.

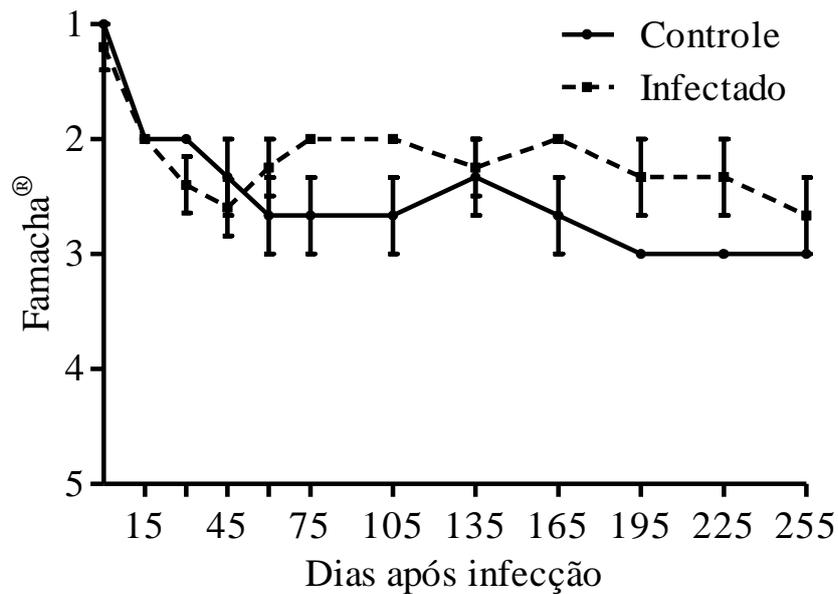


Gráfico 1: Avaliação média e desvio padrão da coloração de mucosa pelo método Famacha® em grupo de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na avaliação da coloração de mucosa ao comparar os grupos do dia 0 aos 255 dpi ($p>0,05$).

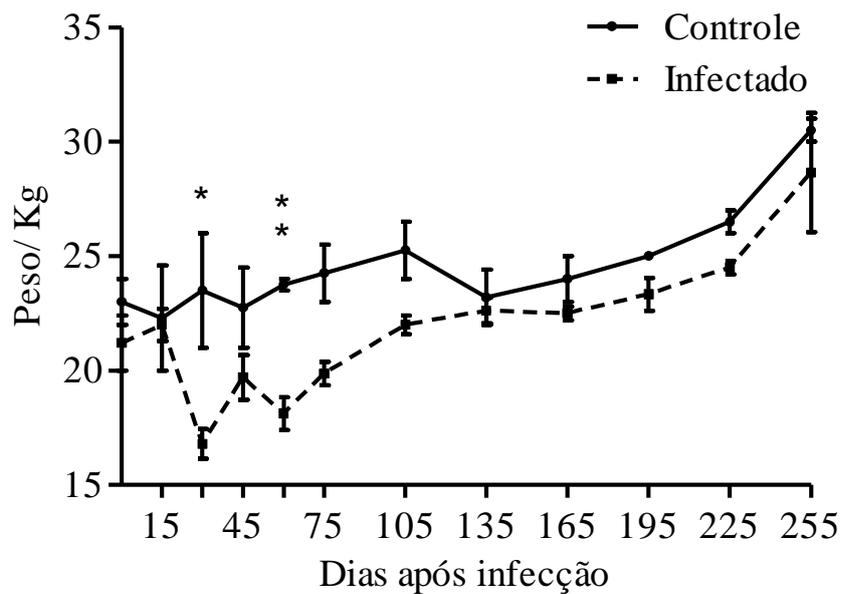


Gráfico 2 - Peso médio e desvio padrão em grupo de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Foi constatada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos com redução no grupo Infectado aos 30 dpi ($p < 0,05$) e aos 60 dpi ($p < 0,01$).

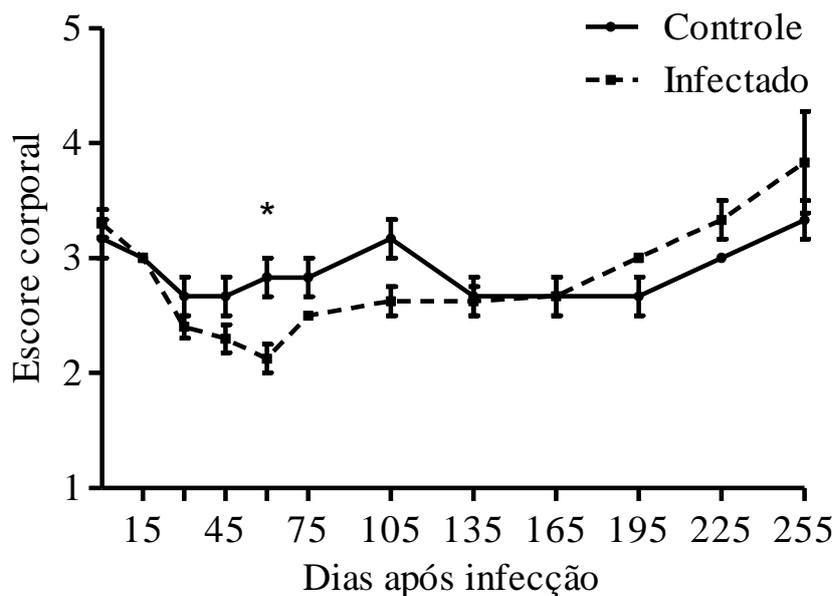


Gráfico 3- Escore corporal médio e desvio padrão em grupo de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Foi constatada diferença estatisticamente significativa com redução no grupo Infectado aos 60 dpi ($p < 0,05$) se comparado ao Controle.

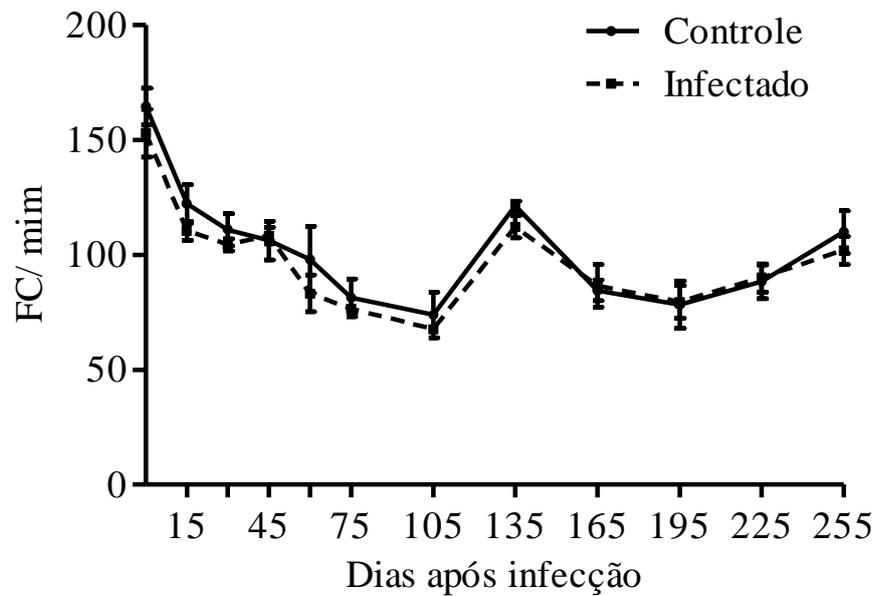


Gráfico 4: Frequência cardíaca média e desvio padrão em grupo de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência cardíaca ao comparar os grupos durante o período estudado ($p > 0,05$).

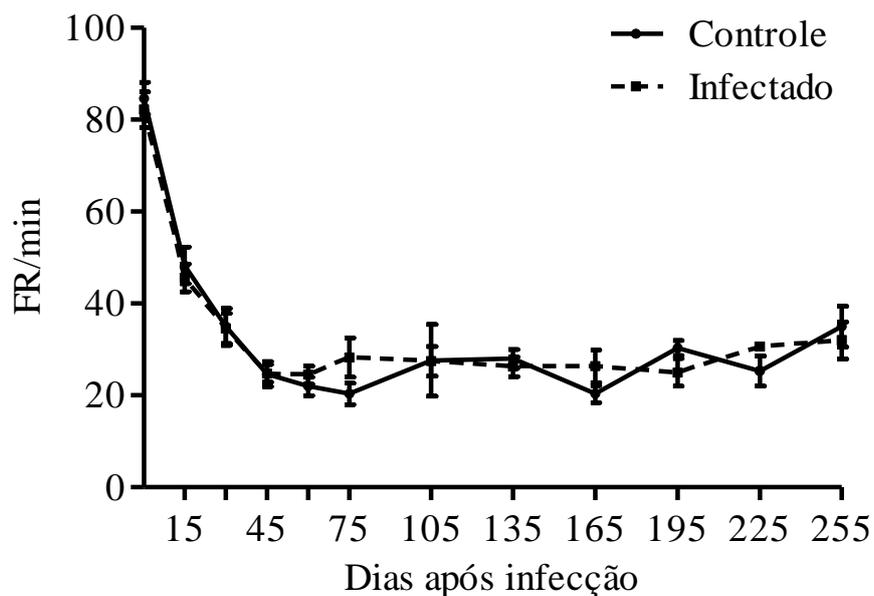


Gráfico 5: Frequência respiratória média e desvio padrão em grupo de ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência respiratória ao comparar os grupos durante o período estudado ($p > 0,05$).

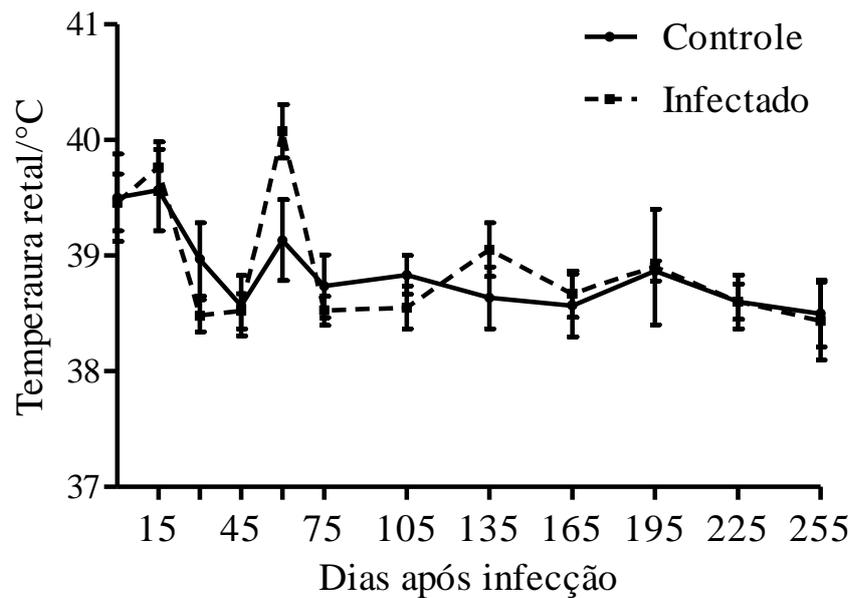


Gráfico 6: Temperatura retal média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na TR ao comparar os grupos durante o período estudado ($p > 0,05$).

5.2.2 Perfil hematológico

Análises na contagem total de hemácias foram realizadas em todos os intervalos (0, 15, 30, 45, 60, 75, 105, 135, 165, 195, 225 e 255 dias). Entretanto, como será abordado a seguir, as variáveis de hematócrito, volume globular médio, hemoglobina e plaquetas têm suas análises até aos 165 dpi, devido ao fato de não haver sido constatado variações significantes após o período de fase aguda entre os grupos Controle e Infectado.

5.2.2.1 Contagem total de hemácias

No Gráfico 7, apresenta-se o número médio de hemácias por mm³ de sangue (10⁶/mm³) de ovinos controles e ovinos infectados por *S. mansoni*. A análise foi realizada do dia 0 até o dia 255 dpi. Os valores de desvio padrão médio são representados em barras verticais.

Como resultado apenas aos 60 dpi foi constatado queda na contagem de hemácias no grupo Infectado, se comparado ao Controle, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). No restante dos intervalos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Infectado; embora o número de hemácias no grupo infectado permanecesse menor dos 60 aos 105 dpi, aos 165 e 255 dpi.

5.2.2.2 Hematócrito

Durante o período de acompanhamento dos ovinos controles e infectados não foi observada diferença estatisticamente significativa nos valores de hematócrito ao se comparar os grupos ($p > 0,05$), como observado no Gráfico 8. Aos 45 dpi o valor de hematócrito foi menor devido aos ovinos 05 (18,2%) e 06 (12,4%).

5.2.2.3 Volume Globular Médio

Os valores de volume globular médio (VGM/fl) dos ovinos controles e infectados podem ser observados no Gráfico 9, bem como o desvio padrão médio para cada intervalo analisado representado em barras verticais. No período em que foi possível obter os resultados, não foi constatada diferença estatisticamente significativa no padrão de VGM/fl entre os animais controles e infectados ($p > 0,05$) durante o período 0 aos 165 dpi, quando os dados foram coletados.

5.2.2.4 Hemoglobina

Na análise de hemoglobina (g/dl) nos animais controles e infectados, não foi observada diferença estatisticamente significativa na análise de comparação dos grupos, durante o período de análise (do dia 0 aos 165 dpi) ($p > 0,05$) (Gráfico 10). Aos 45 dpi o valor de hematócrito foi menor devido aos ovinos 05 (7,2 g/dl) e 06 (3,6 g/dl).

5.2.2.5 Plaquetas

No gráfico 11, estão apresentados os resultados das contagens médias de plaquetas e desvio padrão médio dos animais controles e infectados. Durante o período de dia 0 aos 165 dpi não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos ($p > 0,05$).

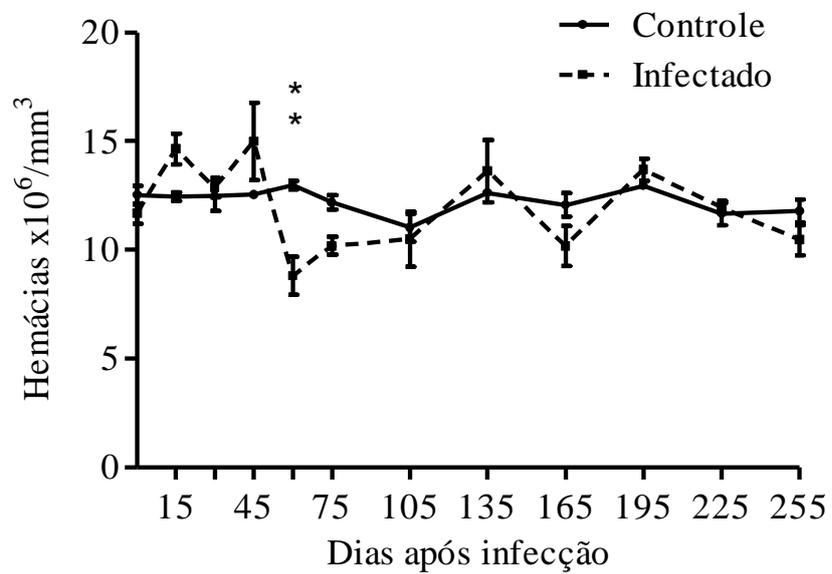


Gráfico 7: Número médio de hemácias e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Houve diferença estatisticamente significativa aos 60 dpi, com redução no número de hemácias no grupo Infectado ($p < 0,01$).

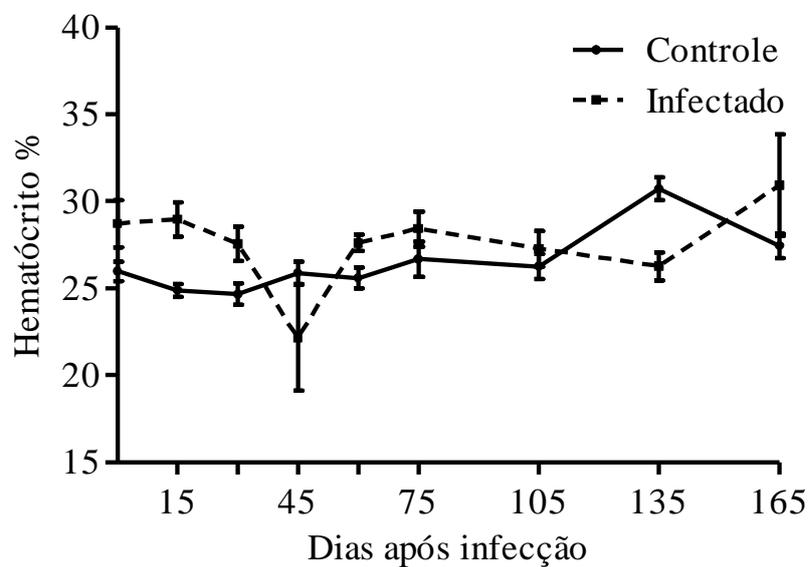


Gráfico 8: Porcentagem média e desvio padrão de hematócrito em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na porcentagem de hematócrito durante todo o período analisado do dia 0 aos 165 dpi ($p > 0,05$).

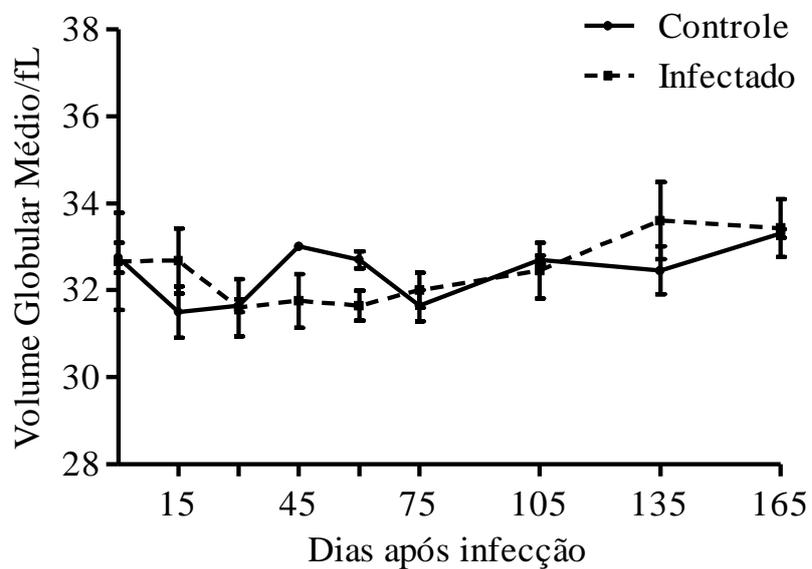


Gráfico 9: Volume Globular Médio e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de VGM durante o período analisado ($p > 0,05$).

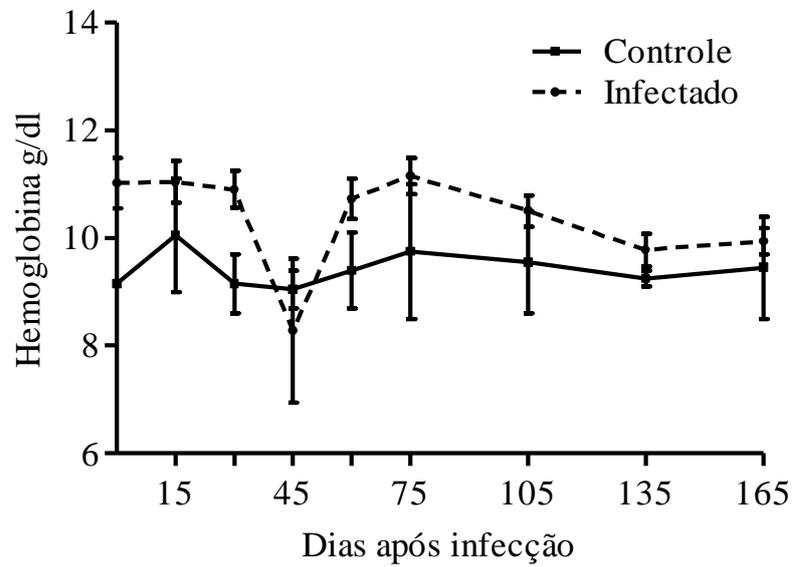


Gráfico 10: Hemoglobina (g/dl) média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de hemoglobina durante o período analisado ($p > 0,05$).

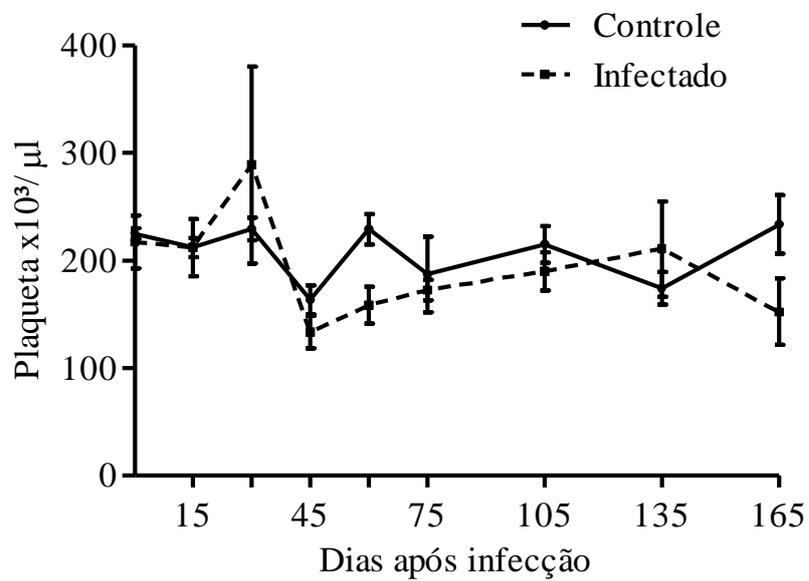


Gráfico 11: Quantificação de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Infectado durante o período analisado ($p > 0,05$).

5.3 Parâmetros imunológicos

5.3.1 Contagem total de leucócitos

No gráfico 12 estão representados os valores médios de leucócitos totais do sangue periférico para cada intervalo analisado, assim como o desvio padrão médio entre o grupo controle e o grupo infectado por *S. mansoni*. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre grupos nos intervalos de 30 dpi ($p < 0,5$) e 60 dpi ($p < 0,001$) com aumento no número de leucócitos dos ovinos infectados se comparados aos controles de 15 aos 105 dpi.

5.3.2 Contagem diferencial de leucócitos

5.3.2.1 Neutrófilos segmentados do sangue periférico

No gráfico 13 está representada a porcentagem da contagem média de neutrófilos segmentados do sangue periférico para os intervalos analisados (dia 0 aos 255 dpi), assim como o desvio padrão médio entre o grupo de ovinos controles e infectados. Observou-se aumento da porcentagem de neutrófilos aos 30 e 60 dpi com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,5$) no grupo infectado se comparado ao controle.

5.3.2.2 Neutrófilos bastonetes do sangue periférico

A porcentagem da contagem de neutrófilos bastonetes no sangue periférico em comparação aos ovinos controles e infectados está representado no gráfico 14. Aos 45 dpi ocorreu diferença estatisticamente significativa na porcentagem de neutrófilos bastonetes do grupo Infectado se comparado ao Controle ($p < 0,05$), porém, durante todo o período experimental as contagens foram maiores no grupo infectado.

5.3.2.3 Linfócitos do sangue periférico

No gráfico 15 encontram-se apresentados a porcentagem da contagem de linfócitos do sangue periférico para os intervalos analisados (dia 0 aos 255 dpi) e o desvio padrão médio entre o grupo de ovinos do grupo Controle e Infectado. A partir de 15 até aos 225 do período experimental as contagens de linfócitos foram mais baixas no grupo Infectado com diferença estatisticamente significativa aos 30 e 60 dpi ($p < 0,05$), com resultado inverso à análise de neutrófilos segmentados registrada nos mesmos períodos.

5.3.2.4 Eosinófilos do sangue periférico

A porcentagem de eosinófilos do sangue periférico, bem como o valor de desvio padrão médio está representada no gráfico 16.

Pode ser observado aumento de eosinófilos durante todo o período de infecção no grupo Infectado em comparação ao grupo Controle, porém, com diferença estatisticamente significativa aos 105 dpi ($p < 0,05$), 135 dpi ($p < 0,001$) e aos 195 dpi ($p < 0,001$).

5.3.2.5 Monócitos do sangue periférico

No gráfico 17 está representada a porcentagem da contagem de monócitos e desvio padrão médio. Não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Infectado durante o período experimental (dia 0 aos 255 dpi).

5.3.2.6 Basófilos do sangue periférico

O resultado da porcentagem referente à contagem de basófilos foi apresentado no gráfico 18; as barras verticais representam o desvio padrão médio de cada intervalo estudado. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos Controle e Infectado durante o período do experimento (dia 0 aos 255 dpi).

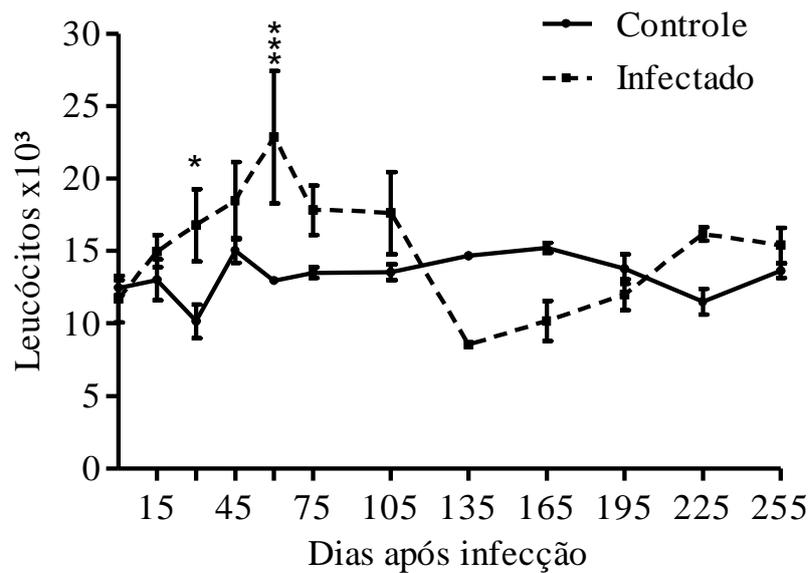


Gráfico 12: Contagem total de leucócitos média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos não infectados. Infectado: Cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Houve aumento entre os valores médios na contagem de leucócitos totais no grupo Infectado com diferença estatisticamente significativa nos intervalos de 30 ($p < 0,05$) e 60 dpi ($p < 0,001$).

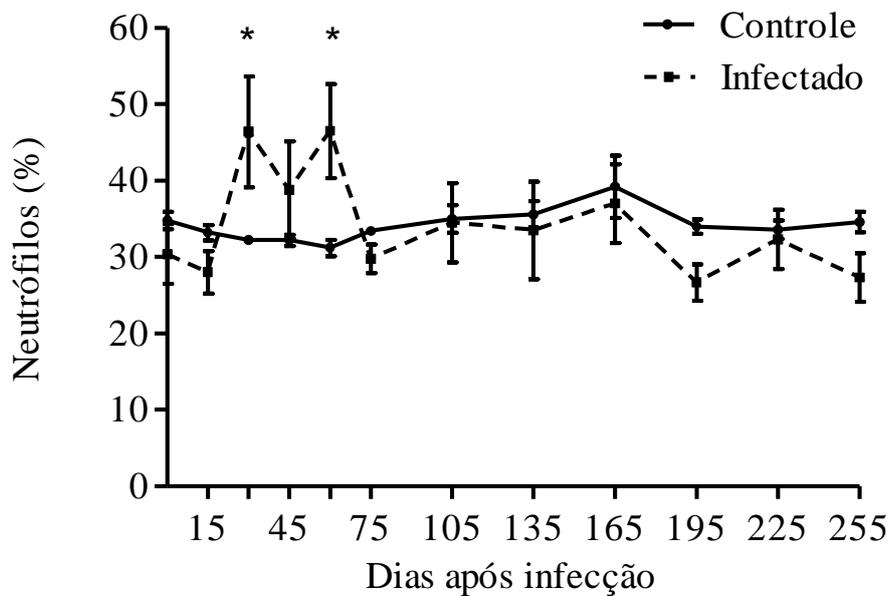


Gráfico 13: Contagem específica de neutrófilos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos livres da infecção. Infectado: Cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Houve aumento entre os valores médios da contagem específica de neutrófilos segmentados no grupo Infectado com diferença estatisticamente significativa nos intervalos de 30 e 60 dpi ($p < 0,05$).

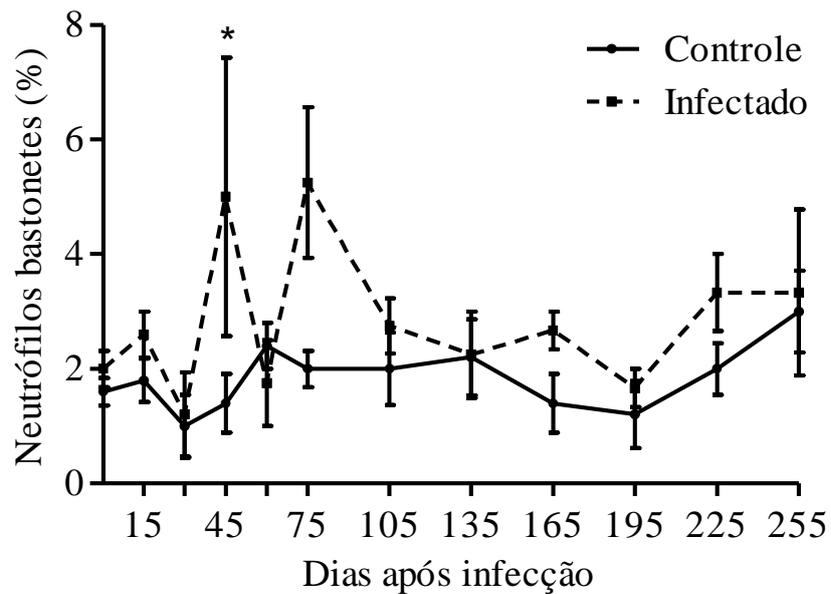


Gráfico 14: Contagem específica de neutrófilos bastonetes por porcentagem média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos livres da infecção. Infectado: Cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Aos 45 dpi houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de neutrófilos bastonetes do grupo Infectado ($p < 0,05$).

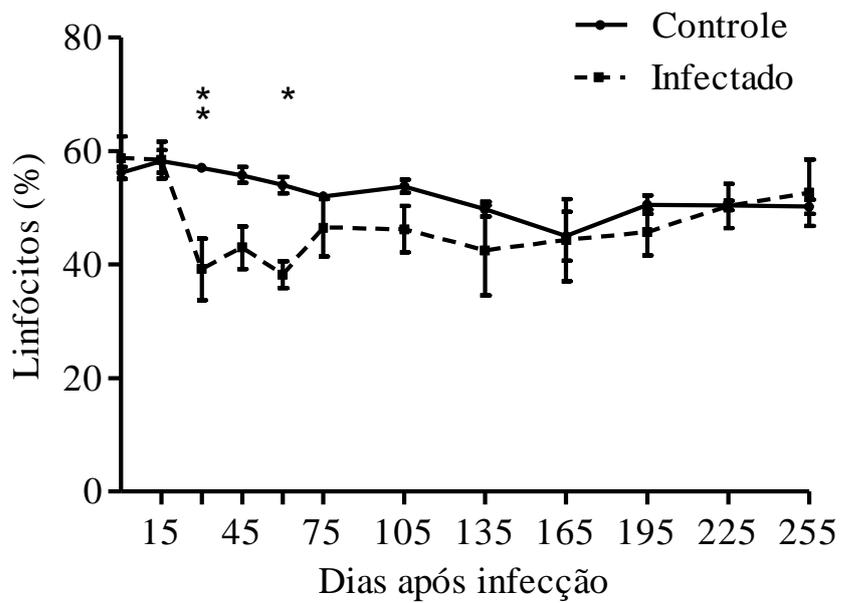


Gráfico 15: Contagem específica de linfócitos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos livres da infecção. Infectado: Cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. O grupo Infectado apresentou diminuição na porcentagem de linfócitos nos intervalos de 30 e 60 dpi, evidenciado por diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente.

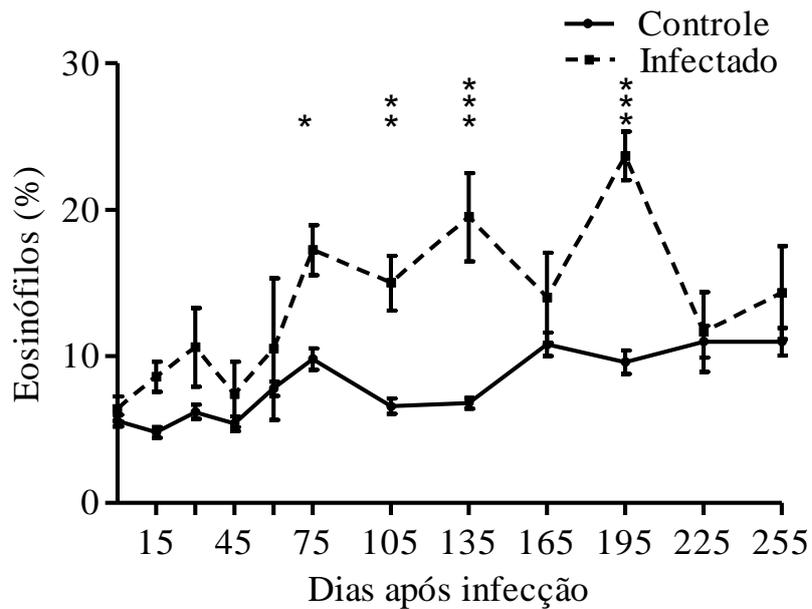


Gráfico 16: Contagem específica de eosinófilos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos livres da infecção. Infectado: Cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Durante todo o período experimental houve aumento entre os valores médios da contagem específica de eosinófilos no grupo Infectado, porém com diferença estatisticamente significativa nos intervalos de 75 dpi ($p < 0,05$), 105 dpi ($p < 0,05$), 135 e 195 dpi ($p < 0,001$).

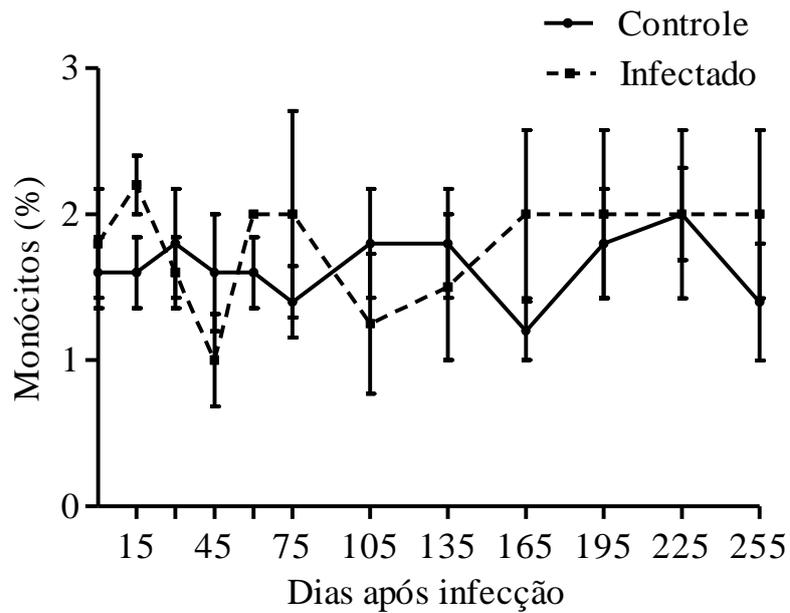


Gráfico 17: Contagem específica de monócitos por porcentagem média e desvio padrão em ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos livres da infecção. Infectado: Cinco ovinos infectados 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não houve em nenhum intervalo analisado diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Infectado ($p>0,05$).

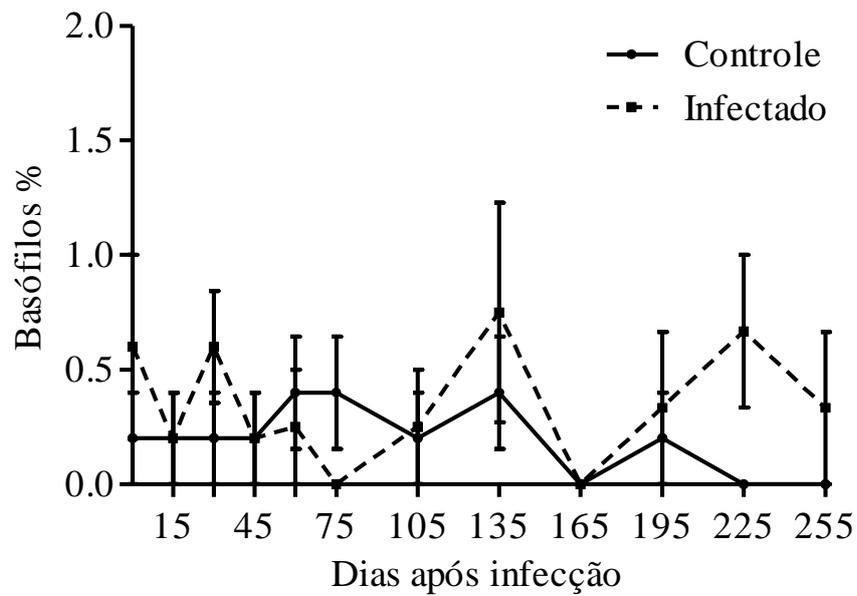


Gráfico 18: Contagem específica de basófilos por porcentagem média e desvio padrão ovinos da raça Santa Inês controles e infectados por *Schistosoma mansoni*. Controle- cinco ovinos livres da infecção. Infectado: Cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Não houve em nenhum intervalo analisado diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Infectado ($p > 0,05$).

5.2.3 Imunoglobulina G sérica

A cinética de anticorpos IgG presentes no plasma dos animais controles e infectados, que reagem especificamente contra antígenos proteicos SWAP (*Soluble Worms Adult Antigen*) de *S. mansoni* foi expressa em valores de absorvância médios. As barras verticais de cada gráfico representa o desvio padrão médio para cada intervalo, durante 255 dias de estudo. Foram realizadas duas diluições 1:200 e 1:400.

Como resultado, o grupo controle não apresentou reatividade durante o período experimental se comparado ao grupo infectado.

A titulação de IgG no grupo infectado na diluição 1:200, caracterizou-se por elevação a partir de 45 dpi e permaneceu elevado até o final do experimento (255 dpi), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os maiores valores obtidos foram aos 75 e 135 dpi (0,239 e 0,247), respectivamente, como demonstrado no gráfico 19 A.

Na diluição 1:400, houve elevação a partir de 30 dpi, porém, os valores com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao Controle ocorreu nos intervalos de 45, 60, 75, 105 e 135 dpi. Todavia, os valores permaneceram aumentados até ao final do experimento, ainda que sem diferença estatisticamente significativa (gráfico 19 B).

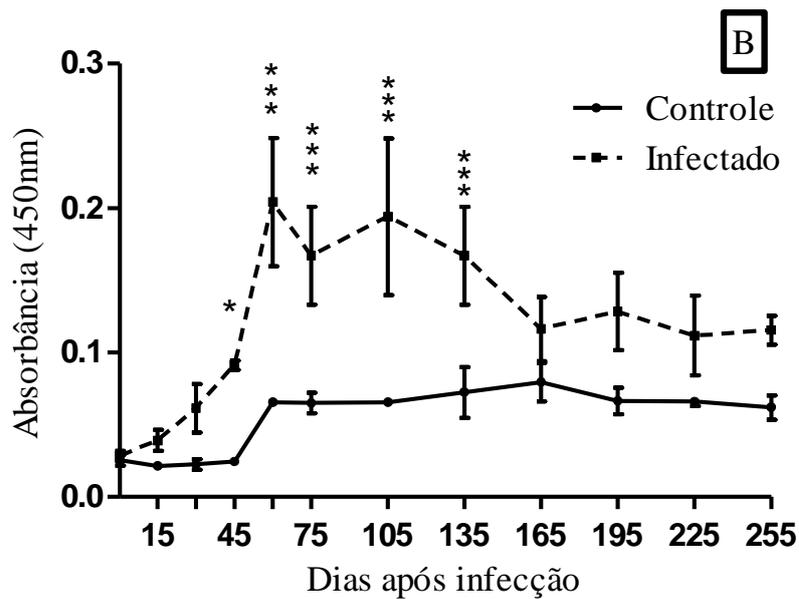
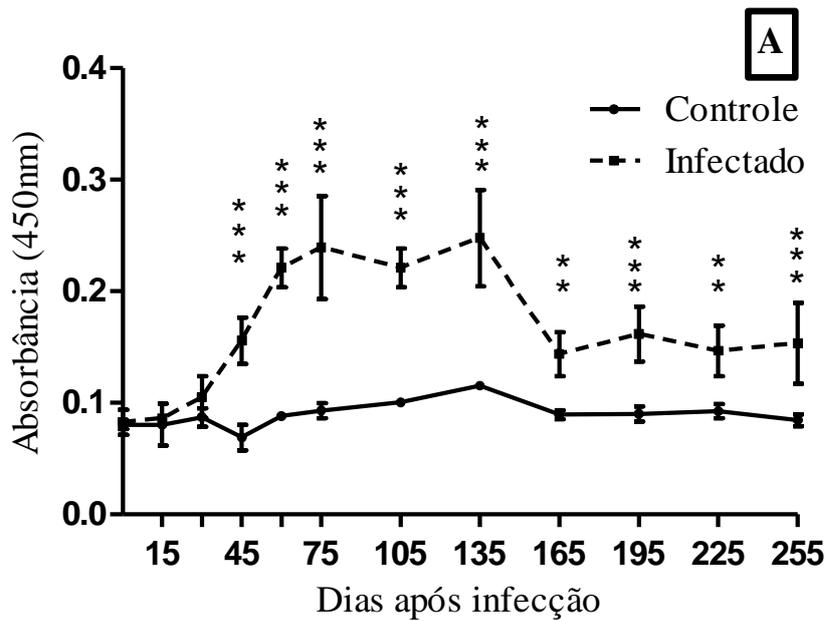


Gráfico 19: Cinética de anticorpos IgG média e desvio padrão, que reagem com antígeno de *Schistosoma mansoni* em plasma de ovinos da raça Santa Inês infectados e controles. Valores médios de absorbância médios, que reconhecem especificamente antígenos proteicos SWAP na diluição 1:200 (A) e 1:400 (B). Controle- cinco ovinos livres da infecção. Infectado- cinco ovinos infectados com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. I- desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ entre os grupos são representados por (*); $p < 0,01$ representados por (**) e $p < 0,001$ por (***)

5.4 Parâmetros parasitológicos

5.4.1 Exame parasitológico de fezes

Este estudo, a princípio utilizou a técnica de sedimentação espontânea para observação de ovos de *S. mansoni* nas amostras fecais dos ovinos. Entretanto, devido à alta quantidade de fibras vegetais e clorofila presentes nas fezes com conseqüente material extremamente turvo, tornou inviável a aplicação da técnica HPJ para visualização de ovos.

Dessa forma, foi utilizada pela primeira vez na literatura a técnica de Girão e Ueno (1982) -quatro tamises modificada- para diagnóstico de ovos de *S. mansoni* em amostras fecais de ovinos, mas a metodologia já é amplamente utilizada no diagnóstico de fasciolose hepática em ruminantes.

As amostras foram pesadas (5gr/ amostra) e utilizados os dois últimos tamises (200 malhas/polegada -87 µm - e 250 malhas/ polegada - 65µm, respectivamente), com passagem da amostra em água corrente resfriada a 4°C para evitar eclosão de possíveis miracídios durante a realização do processo. O sedimento contido na última malha, assim como o sedimento da lavagem, foram colocados em Becker em refrigerador a 4°C para sedimentação do material a ser avaliado (Figura 7A).

Porém, para validar a técnica de Girão e Ueno (1982) no diagnóstico da esquistossomose mansoni em ruminantes, foi realizado o seguinte procedimento: Foram coletadas fezes de camundongos infectados experimentalmente pela via cutânea por *S. mansoni* com eliminação de ovos; as fezes foram misturadas a cinco gramas de fezes de ovinos não infectados. A manipulação da amostra na técnica de quatro tamises procedeu como descrita na metodologia e foi possível observar ovos de *S. mansoni* em microscopia óptica (aumento de 10 e 40X), com utilização da solução azul de metileno para coloração das fibras vegetais abundantes (Figura 7 B).

Após validar a técnica de Girão e Ueno (1982) no diagnóstico de ovos de *S. mansoni*, o mesmo procedimento foi realizado com os animais infectados neste estudo. Entretanto, o exame parasitológico de fezes mostrou-se negativo para ovos de *S. mansoni*. Dessa forma, conclui-se que mesmo não sendo observado resultado positivo nas amostras dos ovinos infectados, a técnica pode ser utilizada no diagnóstico parasitológico por infecção do parasito em ruminantes, tais como bovinos, ao qual, já foi constatado ovos em material fecal (Coelho *et al.*, 1982; Modena, 1989; Modena *et al.*, 1992).

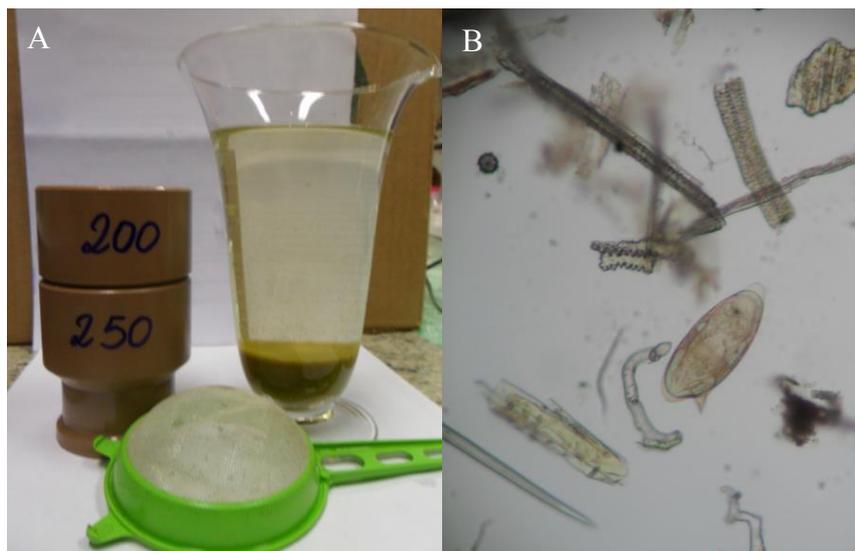


Figura 7: Exame parasitológico de fezes pela técnica de Girão e Ueno (1982) para detecção de ovos de *Schistosoma mansoni*. A- Materiais utilizados para a realização da técnica. B- Controle positivo- ovo proveniente de fezes de camundongos infectados, homogeneizada à amostra fecal de ovino não infectado (notar presença de fibras vegetais a volta).

5.4.2 Método de eclosão de miracídios

Ao realizar os métodos de eclosão de miracídios, constatou-se que pelo fato das fezes de ovinos apresentarem grande quantidade de fibras vegetais e clorofila, ao se misturar à água, a solução se tornava extremamente turva e de tom verde escuro, de forma a impossibilitar a ação da luminosidade sobre o meio e a visualização de miracídios na amostra.

Diante disso, foi procedida a passagem das fezes pela técnica de quatro tamises de Girão e Ueno (1982) em água desclorada a 4°C. Porém, com utilização apenas do penúltimo e último dos tamises (200 malhas/polegada- 87µm e 250 malhas/polegada- 60 µm), após esse processo, o sedimento retido no último tamis foi colocado junto à água desclorada em Becker para sedimentação em refrigerador a 4°C, ao abrigo da luz por 20 minutos. Decorrido esse tempo, o sedimento foi coletado e colocado nos recipientes próprios com água desclorada em temperatura ambiente (média de 25°C) para cada método de eclosão.

Como controle positivo, o mesmo procedimento foi realizado ao misturar fezes de camundongos com esquistossomose mansoni às fezes de ovinos não infectados. O resultado foi positivo em ambas as metodologias, contudo, a observação de miracídios no método de Chaia *et al.* (1968) se sucedeu aos 15 minutos após início do teste e no método de Jurberg *et al.* (2008) foi observado miracídios a partir de 45 minutos.

Como resultado, não foi observada a presença de miracídios de *S. mansoni* pela técnica de Chaia *et al.* (1968) e Jurberg *et al.* (2008) nos exames que utilizaram amostras do

ovinos infectados. Todavia, essas técnicas foram validadas para o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* em ruminantes com utilização prévia da técnica de Girão e Ueno (1982) (malha de 200 e 250 polegadas) como observado no controle positivo descrito em materiais e métodos.

5.4.3 Curetagem de mucosa retal

Após o procedimento de curetagem de mucosa retal, foi observado nos ovinos infectados, grande desconforto, assim como hemorragia discreta, de forma a impossibilitar mais que uma coleta durante cada procedimento. Os animais apresentaram como comportamento anormal, a cauda erguida durante cerca de 4 horas após a curetagem e contração do esfíncter anal. Diante à preservação do bem estar e sanidade dos animais, foram coletadas amostras em sete intervalos. A última coleta foi realizada após o sacrifício dos ovinos infectados, para se evitar maior estresse e sofrimento. Como resultado, em cada intervalo pelo menos um animal demonstrou ovos de *S. mansoni* na mucosa retal, representado na tabela 1, entretanto, em nenhum ovo foi observada viabilidade.

Tabela 1: Resultado de curetagem de mucosa retal, realizado em ovinos da raça santa Inês infectados experimentalmente com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni* por via cutânea.

Curetagem de mucosa retal em ovinos infectados					
Intervalo	1	3	5	6	7
60 dpi	+ 2 ovos Inviáveis	Negativo	Negativo Óbito	Negativo	Negativo
70 dpi	+ 1 ovo Inviável	Negativo	*	Negativo	Negativo
75 dpi	+ 2 ovos Inviáveis	+ 2 ovos Inviáveis	*	Negativo	Negativo
105 dpi	Negativo	Negativo	*	Negativo	+ 2 ovos Inviáveis-ovos hemitransparentes
135 dpi	+ 5 ovos Inviáveis	Negativo	*	+ 2 ovos Inviáveis	+ 1 ovo Inviável
165 dpi	Negativo	+ 1 ovo Inviável	*	*	Negativo
255 dpi	+ Inviáveis	+ Inviáveis	*	*	+ Inviáveis

* Os ovinos nesse período, já haviam sido sacrificados, em exceção ao ovino 05 que morreu ainda no primeiro intervalo de análise.

5.4.4 Detecção de antígeno na urina

A coleta de urina procedeu a campo de forma não invasiva (micção natural) e a avaliação pelo teste rápido *Bilharzia (Schistosoma)* (*For qualitative detection*) do laboratório *Rapid Medical Diagnostics*® para detecção de antígeno na urina foi realizado em duplicata no Laboratório de Esquistossomose mansoni (LESQ) no Centro e Pesquisas René Rachou – Fiocruz- Belo horizonte- Minas gerais em quatro ovinos infectados (01, 03, 06 e 07) aos 135 dpi, em três ovinos (01, 03 e 07- o ovino 06 nesse intervalo já havia sido eutanasiado) aos 255 dpi e em 5 ovinos controles.

No intervalo de 135 dpi, foram observados traço no teste de detecção em três animais infectados. Desses, duas amostras apresentaram traço em apenas um cassete (ovino 01- segundo cassete e 06-primeiro cassete) e na outra amostra, ambos os cassetes demonstraram traços (ovino 03), como representado na figura 8. No teste dos animais controles não foram observados traços.

Porém, ao se realizar o teste aos 255 dpi em três animais que ainda estavam vivos (ovino 01, 03 e 07) nesse intervalo, em nenhum teste foi observado traço.

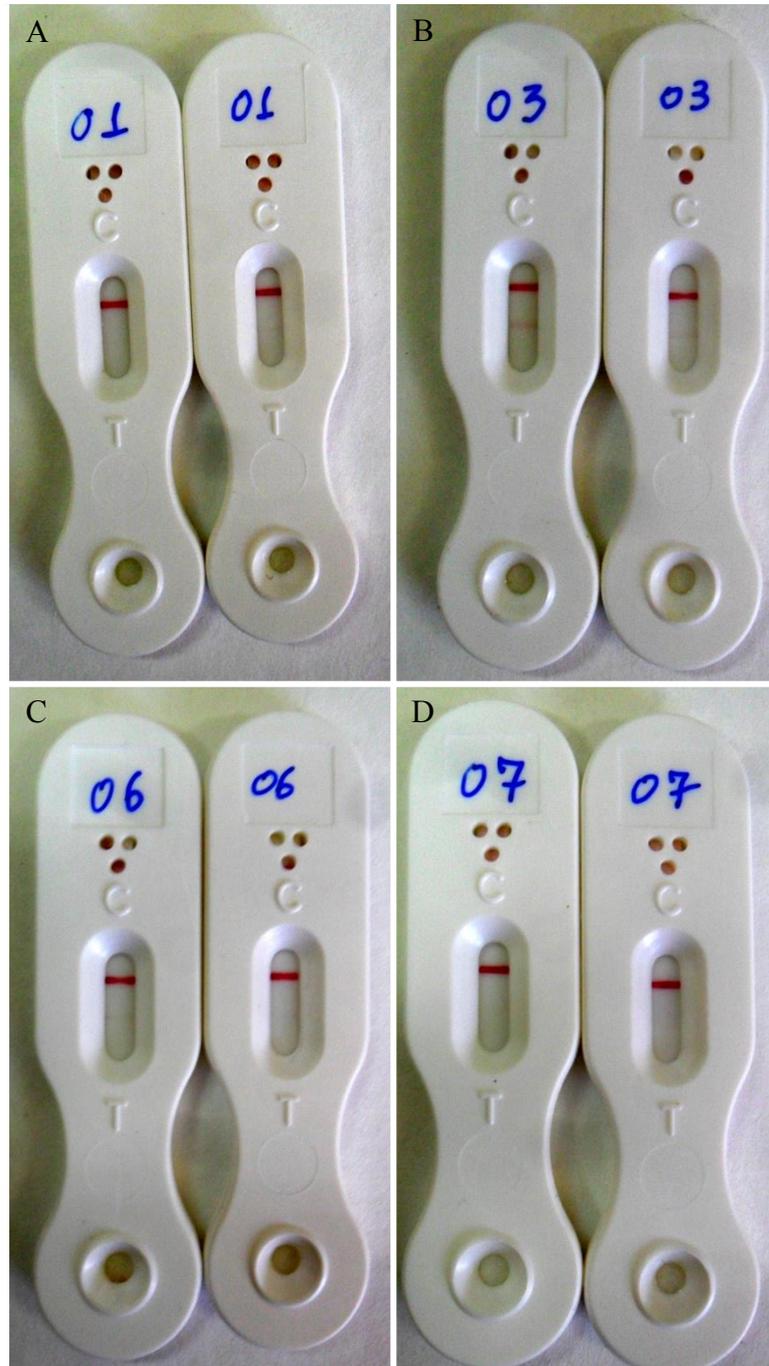


Figura 8: Teste para detecção de antígeno na urina em ovinos infectados pela via cutânea com 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni*. (A) amostra do ovino 01, em que se observa o segundo cassete com traço positivo. (B) amostra do ovino 03, com apresentação de dois cassetes com traço positivo. (C) amostra do ovino 06 com o primeiro cassete positivo (D) 07 sem traço positivo.

5.4.5 Avaliação *post mortem*

5.4.5.1 Aspectos patológicos

5.4.5.1.1 Ovino 01

Fígado

Aspecto macroscópico: Peso de 540 gramas. Superfície externa com cápsula lisa, transparente e brilhante. Na parte superior do lobo direito existia presença de área esbranquiçada de contornos irregulares, medindo aproximadamente 6,0x8cm de diâmetro (Figura 9 A). Na porção superior do lobo esquerdo havia duas lesões esbranquiçadas, com ligeira saliência na superfície com cerca de 1x1cm e de diâmetro cada (Figura 9 A). Na face inferior do lobo direito havia outra lesão esbranquiçada, plana e contorno irregular medindo cerca de 1x1cm de diâmetro.

Aspecto microscópico: As lesões observadas no exame macroscópico eram formadas por grandes granulomas, geralmente irregulares, com área central de aspecto ora homogêneo acidófilo ou com aspecto heterogêneo, com áreas ligeiramente basofílicas entremeadas com áreas acidófilas. Em algumas dessas lesões, o material central está densamente infiltrado por células inflamatórias mononucleares, entre os quais, eram frequentes eosinófilos. Em alguns granulomas o halo de macrófagos epitelióides e células gigantes apresentaram de perneio, numerosos macrófagos espumosos (Figura 10 D).

Nas áreas do parênquima hepático, externamente mais distante dos granulomas, a arquitetura hepática é preservada e os espaços porta mostram aspectos variáveis: (1) a maioria apresenta infiltrado inflamatório discreto, constituído predominantemente com mononucleares que circundam as estruturas da tríade portal sem agressão aparente das mesmas (Figura 10 E). No interior dos lóbulos, os hepatócitos eram íntegros com discreta vacuolização nas áreas mais centrais; (2) alguns espaços porta apresentaram inflamação da parede vascular de modo a comprometer os ramos arteriais e portais com exsudato de polimorfonucleares misturado a material eosinofílico de aspecto fibrinóide (Figura 10 F); (3) em outros espaços porta pôde ser observado discreto espessamento fibroso da adventícia dos vasos; (4) alguns espaços porta apresentaram infiltrado inflamatório peribiliar com abundantes células mononucleares e eosinófilos, frequentemente associados à intensa proliferação ductular, especialmente nos espaços porta próximos às lesões granulomatosas observadas na macroscopia (Figura 10 A); (5) no interior dos lóbulos foram observados raríssimos granulomas epitelióides pequenos,

contendo no interior, estrutura semelhante à casca de ovo de *S. mansoni* (Figura 11 A). Algumas vezes foram observados granulomas epitelióides pequenos, mas sem a presença de material estranho em seu interior (Figura 11 B).

Pulmões

Aspecto macroscópico: Os pulmões apresentaram pleura visceral lisa, transparente e brilhante, sem evidências de lesões macroscópicas externas ou na superfície do corte.

Aspecto microscópico: Foram observadas áreas focais de pneumonite intersticial discreta, semelhante à demonstrada na figura 13 E, do ovino 03.

Baço e linfonodos

Baço com peso de 53,5 gramas. Ambos apresentaram cápsula lisa, transparente e brilhante de contornos e coloração normais no exame macroscópico. Foi constatado na microscopia, arquitetura dentro dos padrões normais dos tecidos e discreto estado reacional do tipo folicular.

5.4.5.1.2 Ovino 03

Fígado

Aspecto macroscópico: Peso de 516 gramas. Superfície externa com cápsula lisa, transparente e brilhante. Foram observados dois nódulos minúsculos na parte inferior do lobo direito, medindo 1mm de diâmetro cada (Figura 9F).

Aspecto microscópico: A arquitetura hepática mostrou-se preservada e a maioria dos espaços porta apresentou infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares, na maioria das vezes, sem agressão às estruturas portais. Em poucos espaços porta eram observados, além do infiltrado inflamatório com maior frequência em polimorfonucleares, moderada proliferação ductular (Figura 10 C e D). Também nesses espaços porta, algumas vezes observava-se extensão do exsudato para a parede vascular. Foi constatado apenas um espaço porta alargado, com fibrose extensa e infiltrado inflamatório mononuclear, especialmente nas áreas mais periféricas, com moderada proliferação biliar (Figura 10 E). Não foram observados granulomas.

Pulmão

Aspecto macroscópico: Os pulmões apresentaram pleura visceral lisa, transparente e brilhante, sem evidências de lesões macroscópicas externas ou na superfície do corte. Entretanto, na parte inferior do lobo inferior do lobo direito havia lesões nodulares irregulares, confluentes, abrangendo área com cerca de 2cm de diâmetro de coloração cinza escuro com áreas centrais esbranquiçadas (Figura 13A).

Aspecto microscópico: As lesões observadas na macroscopia eram semelhantes às observadas no fígado do ovino 01, ou seja, grandes granulomas em torno de material amorfo com graus variáveis de infiltração leucocitária circundada por um halo de macrófagos epitelióides e células gigantes (Figura 13 B). Mais externamente, observou-se fibrose acentuada que, as vezes, aproximava-se do material amorfo (Figura 13 D). No restante do parênquima pulmonar, eram observadas áreas focais de pneumonia intersticial (Figura 13 E). Foi constatado granuloma frouxo com células gigantes irregulares, sem relação com material em seu interior (Figura 13 C).

Baço e linfonodos

Baço com 57,5 gramas. Ambos apresentaram cápsula lisa, transparente e brilhante de contornos e coloração normais no exame macroscópico. Foi constatado na microscopia, arquitetura dentro dos padrões de normalidade do tecido e discreto estado reacional do tipo folicular.

5.4.5.1.3 Ovino 06

Fígado

Aspecto macroscópico: Peso de 387 gramas. Superfície externa lisa, transparente e brilhante. Havia dois nódulos de 2 e 3mm de diâmetro esbranquiçados e agrupados, formando lesão de aproximadamente 8mm na superfície do órgão, na face superior do lobo esquerdo (Figuras 9 C e D). Na parte superior do lobo direito foi localizado pequeno nódulo esbranquiçado medindo 1,5mm, próximo ao limite com o lobo esquerdo (Figura 9E).

Aspecto microscópico: A lesão observada macroscopicamente mostra áreas focais de necrose, com infiltrado inflamatório de polimorfonucleares, circundada por halo de macrófagos epitelióides e grande quantidade de células mononucleares (Figura 11 F). Próximo a essas áreas, os espaços porta estão densamente infiltrados por células mononucleares, que invadem o interior dos lóbulos, destruindo trabéculas de hepatócitos (Figura 12 A). No restante do parênquima, observou-se grande parte dos espaços porta com discreto infiltrado inflamatório com mononucleares. Não foram observados granulomas.

Pulmão

Aspecto macroscópico: Os pulmões apresentaram pleura visceral lisa, transparente e brilhante, sem evidências de lesões macroscópicas externas ou na superfície do corte.

Aspecto microscópico: Foram observadas áreas focais de pneumonite intersticial discreta, semelhante à demonstrada na figura 13 E, do ovino 03.

Baço e linfonodos

Baço com 36 gramas. Ambos apresentaram cápsula lisa, transparente e brilhante de contornos e coloração normais no exame macroscópico. Foi constatado na microscopia, arquitetura dentro dos padrões de normalidade do tecido e discreto estado reacional do tipo folicular.

5.4.5.1.4 Ovino 07

Fígado

Aspecto macroscópico: Peso de 554 gramas. Superfície externa com cápsula lisa, transparente e brilhante. Na face inferior do fígado, no lobo direito próximo ao limite com o lobo esquerdo foram observadas duas lesões esbranquiçadas, medindo 3mm de diâmetro cada uma (Figura 9 G). Na borda do lobo direito havia lesão irregular esbranquiçada com áreas ligeiramente deprimidas medindo cerca de 1x0,8cm de diâmetro (Figura 9 H).

Aspecto microscópico: As áreas observadas na macroscopia apresentaram lesões granulomatosas, irregulares e confluentes, com características semelhantes às descritas no ovino 01: material amorfo com grau variável de infiltração leucocitária circundada por macrófagos epitelióides, grande quantidade de células gigantes e presença de macrófagos espumosos (Figuras 12 B e C). Mais externamente existe um intenso infiltrado de mononucleares e proliferação vascular. Em algumas áreas, a cápsula de *Glisson* é espessada e os espaços porta mais periféricos apresentam infiltrado inflamatório de mononucleares às vezes intenso, assumindo aspecto folicular, com material calcificado em seu interior (Figura 12 D). Foram observados alguns granulomas epitelióides com células gigantes e um deles apresentava material semelhante a restos de casca de ovo de *S. mansoni* (Figura 12 E). Em um espaço porta e no interior de um lóbulo foram observados dois granulomas, contendo em seu interior estruturas semelhantes a ovos embrionados de *S. mansoni* (Figuras 12 F e G). Na maior parte do parênquima hepático, os espaços porta apresentaram infiltrado inflamatório discreto.

Pulmão

Aspecto macroscópico: Os pulmões apresentaram pleura visceral lisa, transparente e brilhante, sem evidências de lesões macroscópicas externas ou na superfície do corte.

Aspecto microscópico: Foram observadas áreas focais de pneumonite intersticial discreta semelhante à demonstrada na figura 13 E, do ovino 03.

Baço e linfonodos

Baço com 56 gramas. Ambos apresentaram cápsula lisa, transparente e brilhante de contornos e coloração normais no exame macroscópico. Foi constatado na microscopia, arquitetura dentro dos padrões de normalidade do tecido e discreto estado reacional do tipo folicular.

Figura 9: Aspecto macroscópico ao exame *post mortem* de fígados dos ovinos infectados experimentalmente com média de 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni* por via cutânea- Ovino 01- (A) Lesões. Setas pretas- parte superior do lobo direito. Área esbranquiçada de contorno irregular, com aproximadamente 6,0x8cm de diâmetro. Setas brancas- porção superior do lobo direito com duas lesões esbranquiçadas e com ligeira saliência na superfície medindo cerca de 1x1cm e 2,2cm de diâmetro. (B) Face inferior do lobo direito. Lesão esbranquiçada, plana e de contorno irregular medindo 1x1cm. Ovino 06- (C e D) Seta preta- face superior do lobo esquerdo. Dois nódulos de 2 e 3mm de diâmetro esbranquiçado e agrupado, com formação de lesão com aproximadamente 8mm de diâmetro.(E) Parte superior do lobo direito. Nódulo esbranquiçado medindo 1,5mm, próximo ao limite do lobo esquerdo. Ovino 07 (F) Face inferior do fígado, no lobo direito entre o limite do lobo esquerdo. Setas pretas- Duas lesões esbranquiçadas, medindo 3mm de diâmetro cada. (G) Borda do lobo direito. Seta preta- Lesão irregular esbranquiçada com áreas ligeiramente deprimidas medindo aproximadamente 1x0,8cm de diâmetro. Ovino 03 (H) Parte inferior do lobo direito. Seta branca- Dois nódulos esbranquiçados, com cerca de 1mm de diâmetro cada.

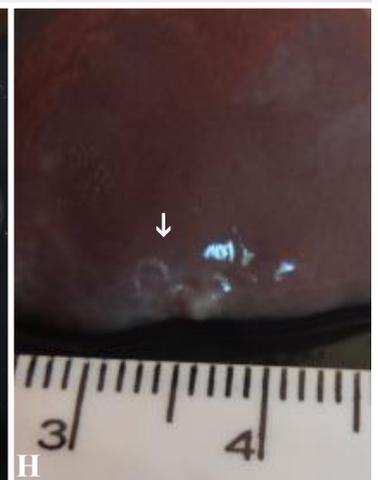
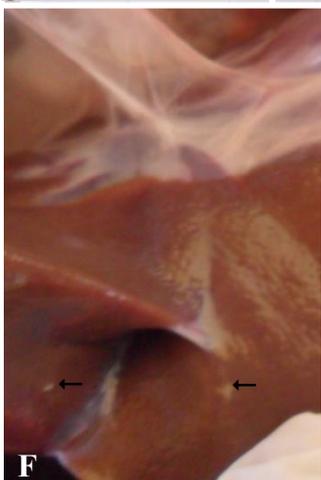
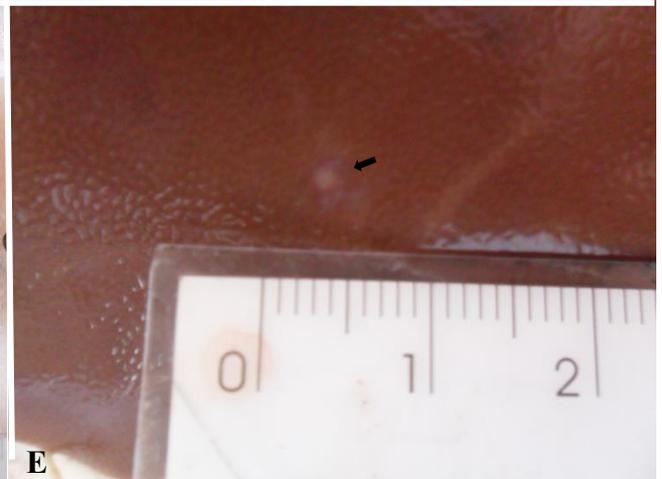
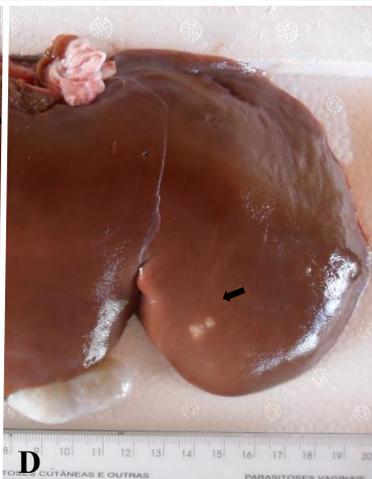
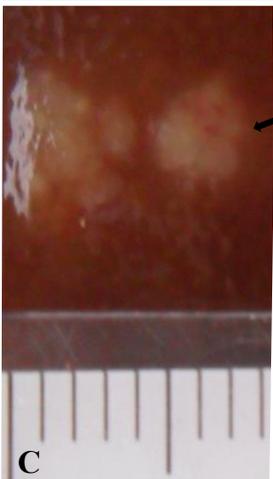
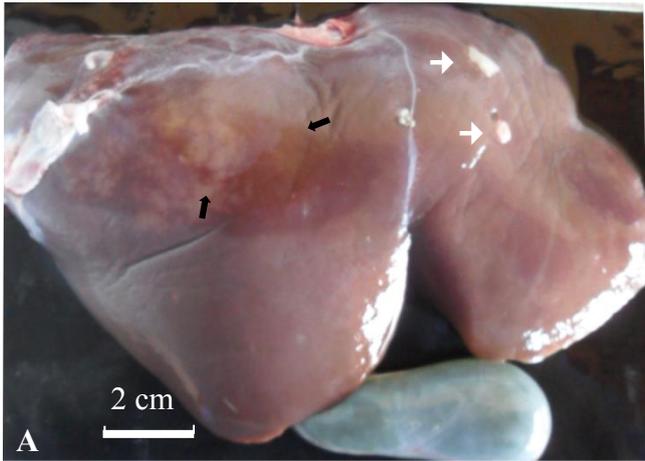


Figura 10: Aspecto microscópico ao exame *post mortem* de fígados dos ovinos infectados experimentalmente com média de 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni* por via cutânea- Ovino 01 (A) Granulomas com área central de aspecto homogêneo acidófilo intercalando com aspecto heterogêneo, com áreas basofílicas entremeadas com áreas acidófilas. a- material amorfo, infiltrado por células inflamatórias, frequentemente degeneradas e descaracterizadas com núcleo picnótico. b- espaço porta com infiltrado peribiliar e intensa proliferação ductular, próximo as lesões granulomatosas. (B) Tecido com granuloma. a- material amorfo, infiltrado por células inflamatórias, frequentemente degeneradas e descaracterizadas. Cabeça de seta- Periferia do depósito amorfo. Infiltrado celular composto por grande quantidade de macrófagos e eosinófilos. Maior aumento- macrófagos com aspecto de paliçada e formação de células gigantes justapostas ao material amorfo. (C) Região do granuloma. a- Material amorfo. Na periferia observa-se grande quantidade de células inflamatórias. Maior aumento- células degeneradas e presença de macrófagos e eosinófilos. (D) Periferia do depósito amorfo com halo macrófagos em aspecto de paliçada. a- Material amorfo. Cabeça de seta- células gigantes. Seta preta- macrófagos com aspecto espumoso. (E) Parênquima hepático. Setas- infiltrado inflamatório discreto, constituído em suma maioria por mononucleares a circundar a tríade portal, sem lesão aparente das mesmas. (F) Parênquima hepático. Cabeça de seta- Espaços porta com inflamação da parede vascular e comprometimento dos ramos arteriais e portais. Maior aumento- exsudato de polimorfonucleares misturado a material eosinofílico de aspecto fibrinóide.

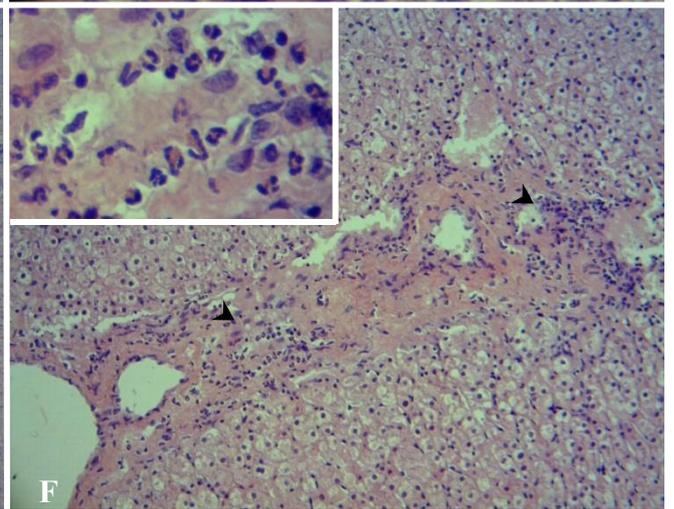
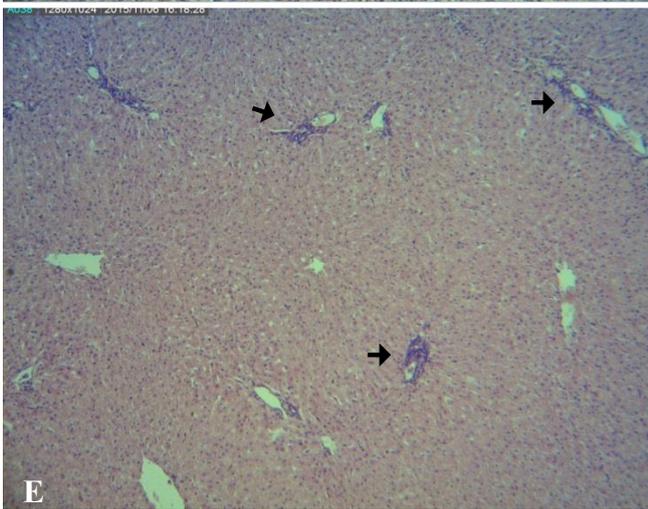
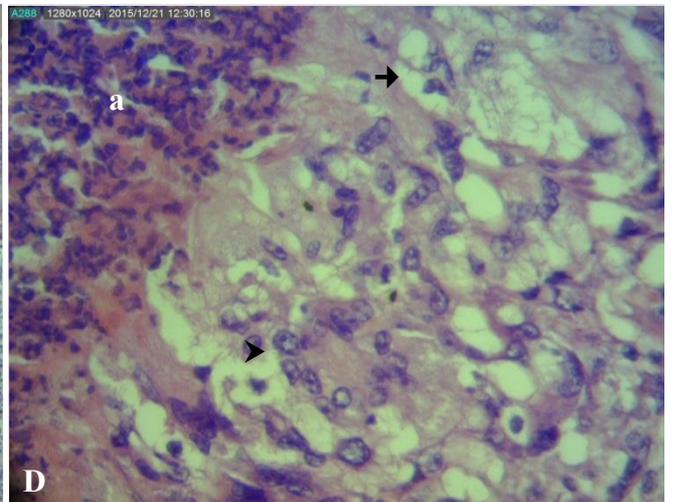
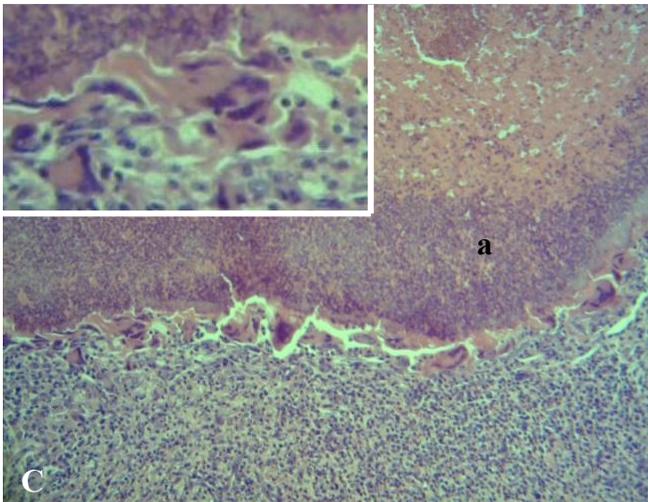
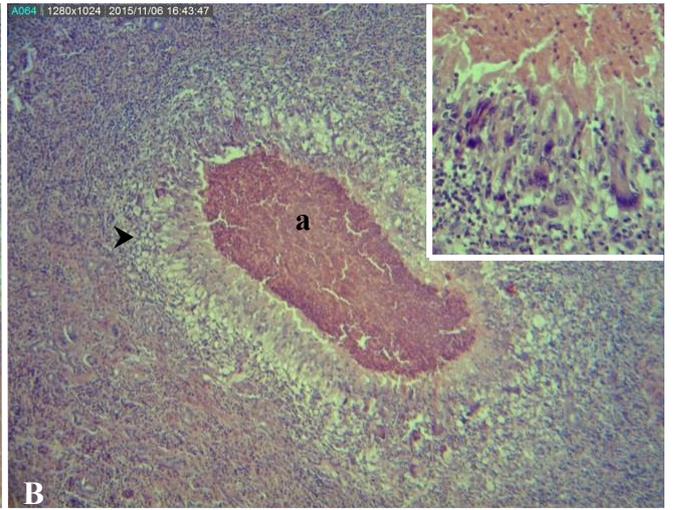
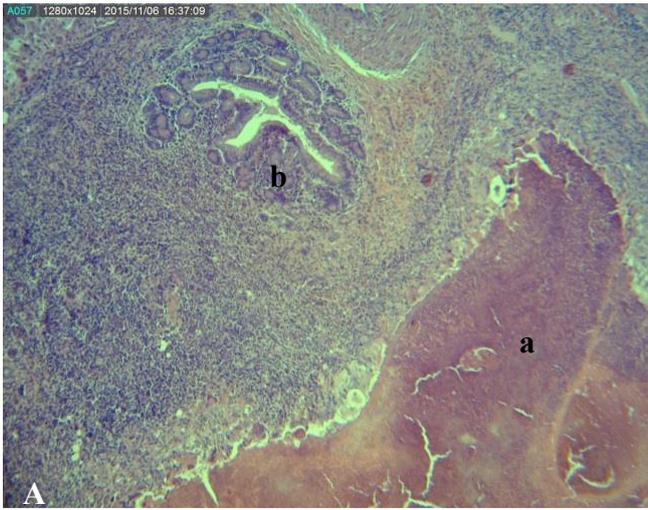


Figura 11: Aspecto microscópico ao exame *post mortem* de fígados dos ovinos infectados experimentalmente com média de 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni* por via cutânea- Ovino 1- (A e B) Interior dos lóbulos. Granulomas epitelióides pequenos. (A) ponta de seta- estrutura semelhante à casca de ovo de *Schistosoma mansoni*. Em (B) não é possível observar qualquer material estranho no interior do granuloma. Ovino 03- (C e D) Arquitetura hepática preservada, com áreas focais de infiltrado inflamatório em maior frequência de polimorfonucleares. (D) Espaço porta com infiltrado em maioria de polimorfonucleares, moderada proliferação ductular e extensão de exsudato para a parede vascular. (E) Espaço porta. Alargamento das paredes, fibrose extensa, infiltrado inflamatório mononuclear a circundar o espaço portal. Setas pretas- proliferação ductular moderada. Ovino 06- (F) Área focal de necrose e infiltrado inflamatório de polimorfonucleares, circundada por halo de macrófagos epitelióides e células mononucleares.

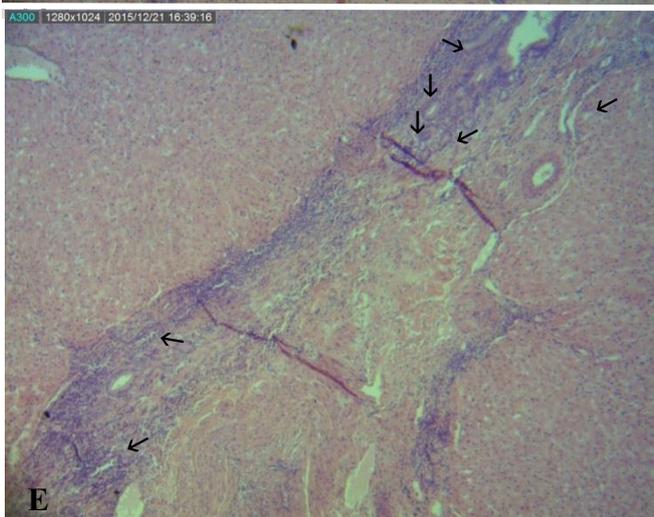
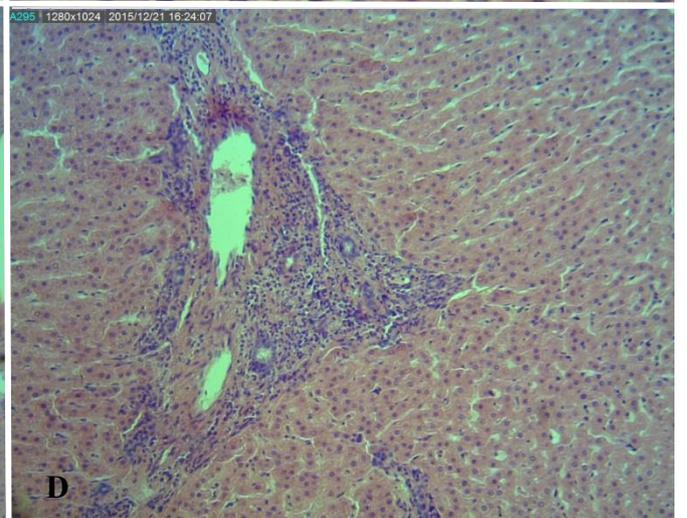
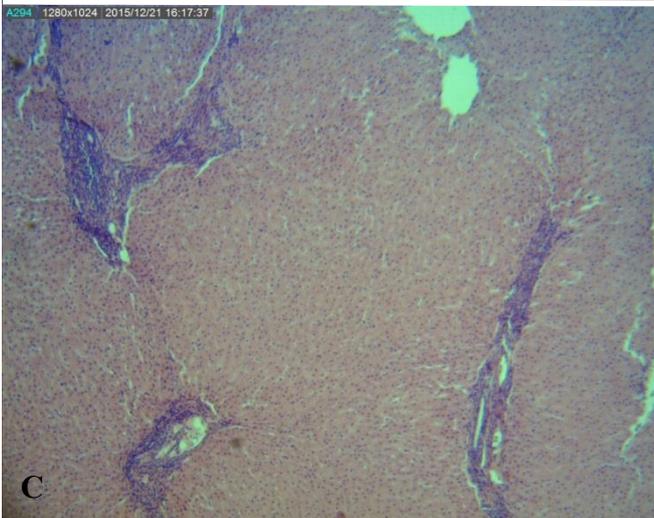
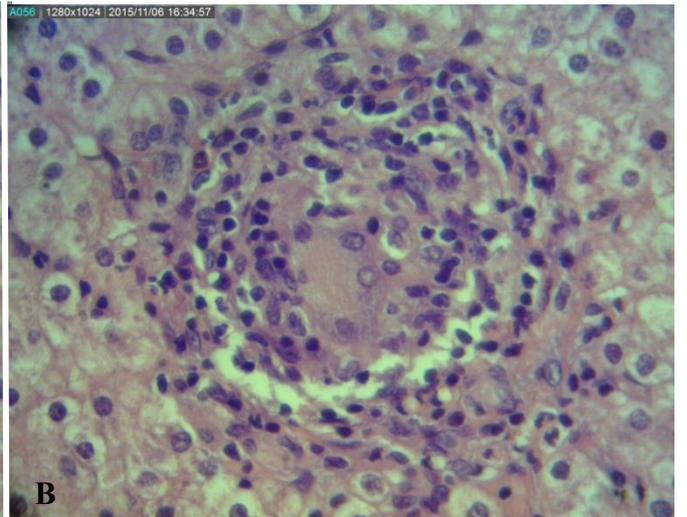
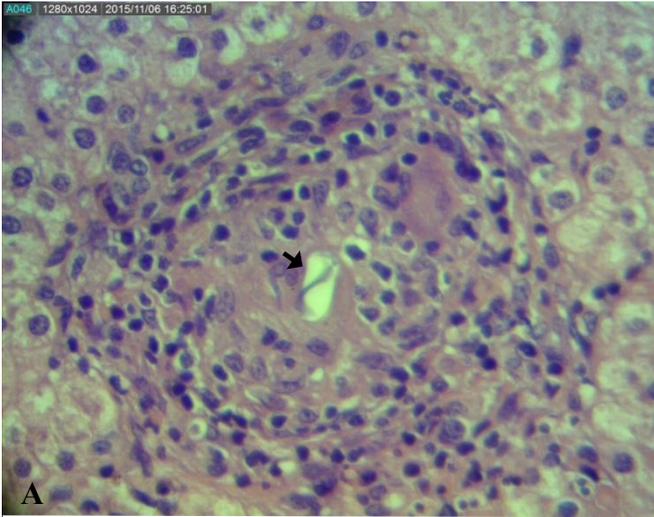
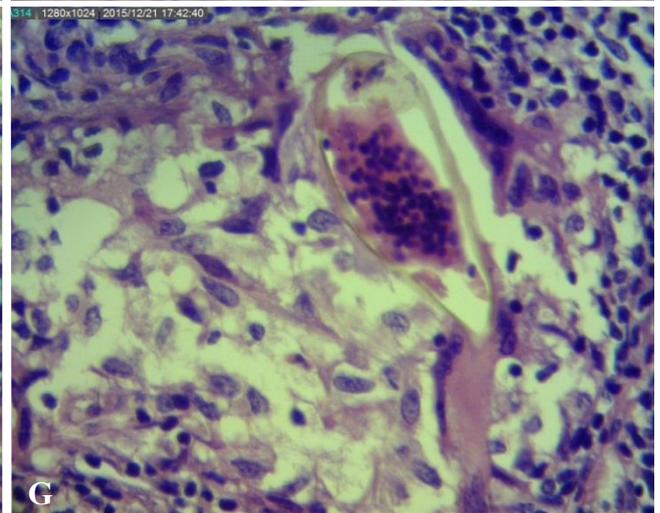
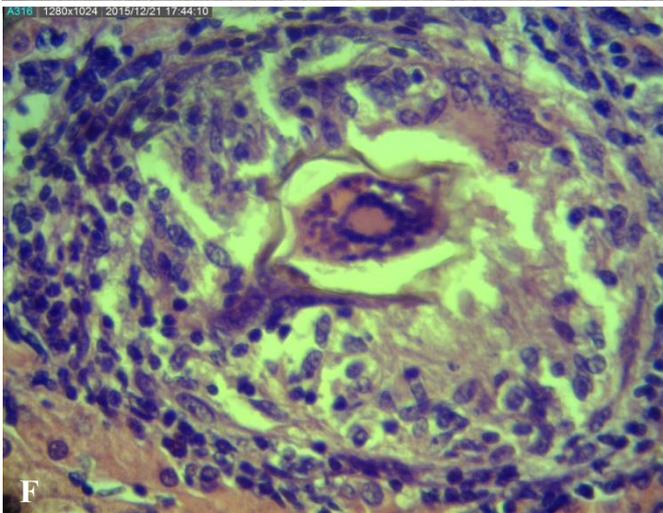
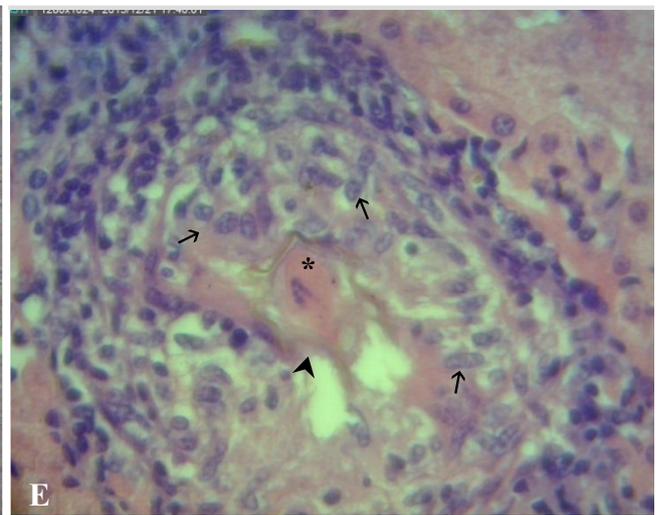
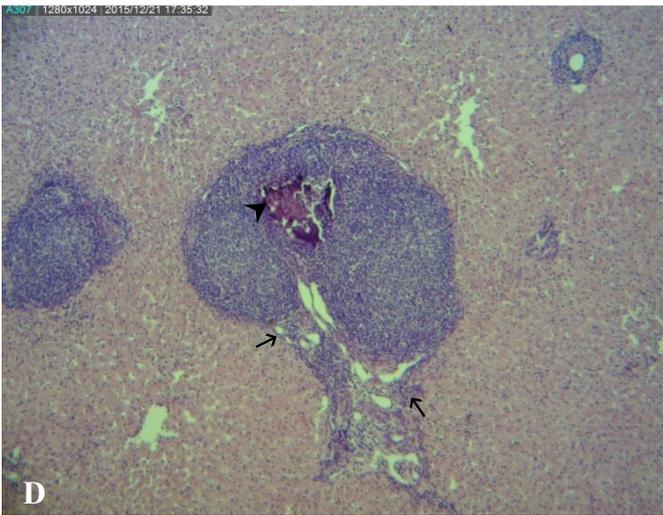
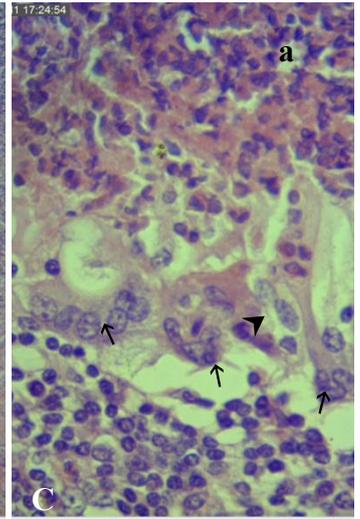
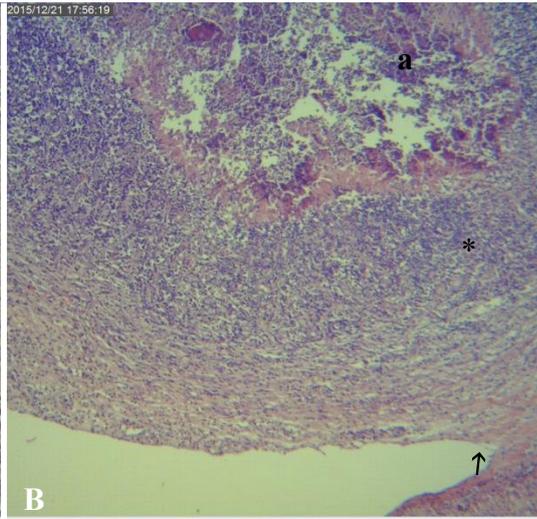
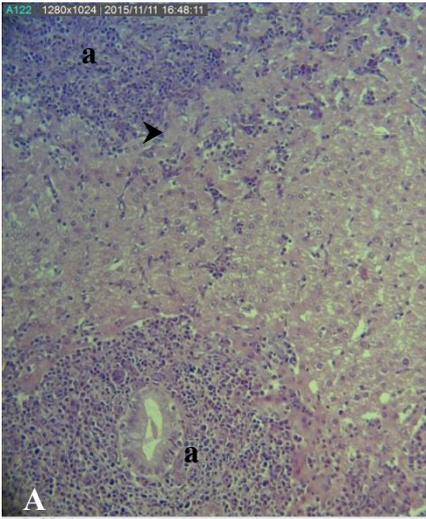


Figura 12: Aspecto microscópico ao exame *post mortem* de fígados dos ovinos infectados experimentalmente com média de 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni* por via cutânea-
Ovino 06- (A) áreas focais de necrose, a- material amorfo rodeado por infiltrado inflamatório. Cabeça de seta- área de desestruturação a arquitetura hepática com necrose, infiltrado mononuclear em expansão para o interior dos lóbulos, com destruição de trabéculas e hepatócitos. Ovino 07- (B) Granuloma e infiltrado inflamatório. a- material amorfo. Asterisco- halo inflamatório leucocitário abundante de forma a rodear o material necrótico. Seta- Cápsula hepática com presença de infiltrado celular inflamatório. (C) Maior aumento. a- material necrótico amorfo. Setas- células gigantes. Cabeça de seta- macrófago espumoso. (D) Área de necrose e infiltração de células inflamatórias mononucleares, com aspecto folicular. Cabeça de seta- material amorfo em granuloma e calcificação em seu interior. Setas- Espaços porta periféricos com infiltrado inflamatório de mononucleares, de aspecto folicular e proliferação ductular. (E) Granuloma epitelióide. Setas- células gigantes. Cabeça de seta- estrutura semelhante à casca de ovo de *Schistosoma mansoni*. Asterisco- material amorfo no centro do granuloma. (F e G) Dois granulomas em espaço porta. No interior pode ser observada estrutura semelhante a ovos embrionados de *Schistosoma mansoni*.



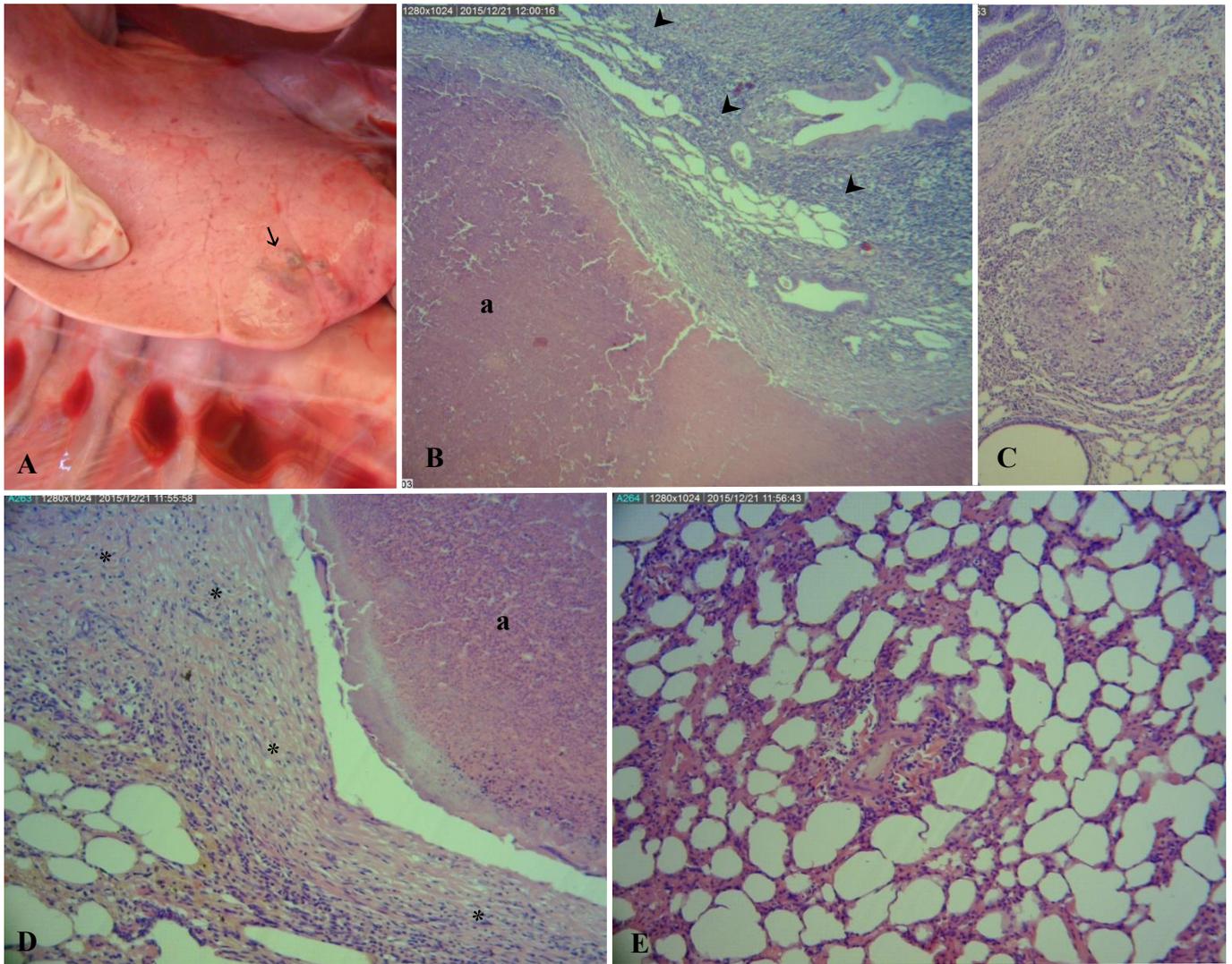


Figura 13: Aspecto macroscópico e microscópico ao exame *post mortem* dos pulmões do ovino 03 infectado experimentalmente com média de 2.000 cercárias de *Schistosoma mansoni* por via cutânea. Aspecto macroscópico- (A) Lobo inferior do pulmão direito: lesões nodulares, irregulares e confluentes, com cerca de 2cm de diâmetro. Aspecto microscópico - (B) Lesão granulomatosa. a - Material amorfo. Cabeça de seta - infiltração leucocitária. (C) granuloma de aspecto frouxo. (D) a - Material amorfo. Asteriscos - Fibrose acentuada em torno de material necrótico. (E) Áreas focais de pneumonite intersticial discreta.

5.4.2 Recuperação de *Schistosoma mansoni* em órgãos

Foram encontrados parasitos de *S. mansoni* no espaço portal e nos vasos mesentéricos de ovinos infectados, de acordo com a metodologia proposta por Coelho *et al.* (1982). Porém, somente a perfusão não foi satisfatória na recuperação dos parasitos, dessa forma, os vasos sanguíneos foram analisados visualmente e os parasitos, retirados manualmente com uso de estiletos e pincéis, como representados nas figuras 14 e 15. Contudo, muitos espécimes foram danificados durante o processo de recuperação, dessa forma, foi preconizada a quantificação apenas dos fragmentos com a porção anterior do parasito, onde foi possível diferenciar as ventosas, o que evitou contar o mesmo parasito fragmentado mais de uma vez.

O ovino 05 morreu aos 53 dpi, devido à lesão medular decorrente de acidente na propriedade rural.

A taxa de recuperação foi de 0,9% (18 parasitos- ovino 01), 0,6% (12 parasitos- ovino 03), 0,45% (9 parasitos- ovino 05), 0,55% (11 parasitos- ovino 06) e 5,45% (109 parasitos (ovino 07) (Quadro 2). Também pôde ser observado cinco casais de *S. mansoni* em cópula, como observado na figura 14.

O ovino 03 foi sacrificado aos 255 dpi, porém, a recuperação de parasitos foi dificultada devido à formação de coágulos nos vasos mesentéricos e espaço portal, com impedimento de uma completa perfusão e visualização de parasitos.

Foi realizada a medida quanto ao comprimento de vinte e dois parasitos machos, com variáveis entre 4,10mm e 6,2mm (média de 5mm) e quatro fêmeas, medindo entre 5,05mm e 9,2mm (média de 7mm) (Figura 15).

Quadro 2: Recuperação de parasitos *Schistosoma mansoni* em ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados por via cutânea com 2.000 cercárias.

Animal	Órgão	Machos	Fêmeas	Cópula Casal	Total
01	Vasos mesentéricos	8	3	0	18 (0,9%)
	Espaço portal	7	0	0	
03	Vasos mesentéricos	5	1	1	12 (0,6%)
	Espaço portal	4	0	0	
05	Vasos mesentéricos	7	2	0	9 (0,45%)
	Espaço portal	0	0	0	
06	Vasos mesentéricos	7	2	0	11 (0,55%)
	Espaço portal	2	0	0	
07	Vasos mesentéricos	47	41	0	109 (5,45%)
	Espaço portal	16	1	2	
Total		103	50	3 casais	159

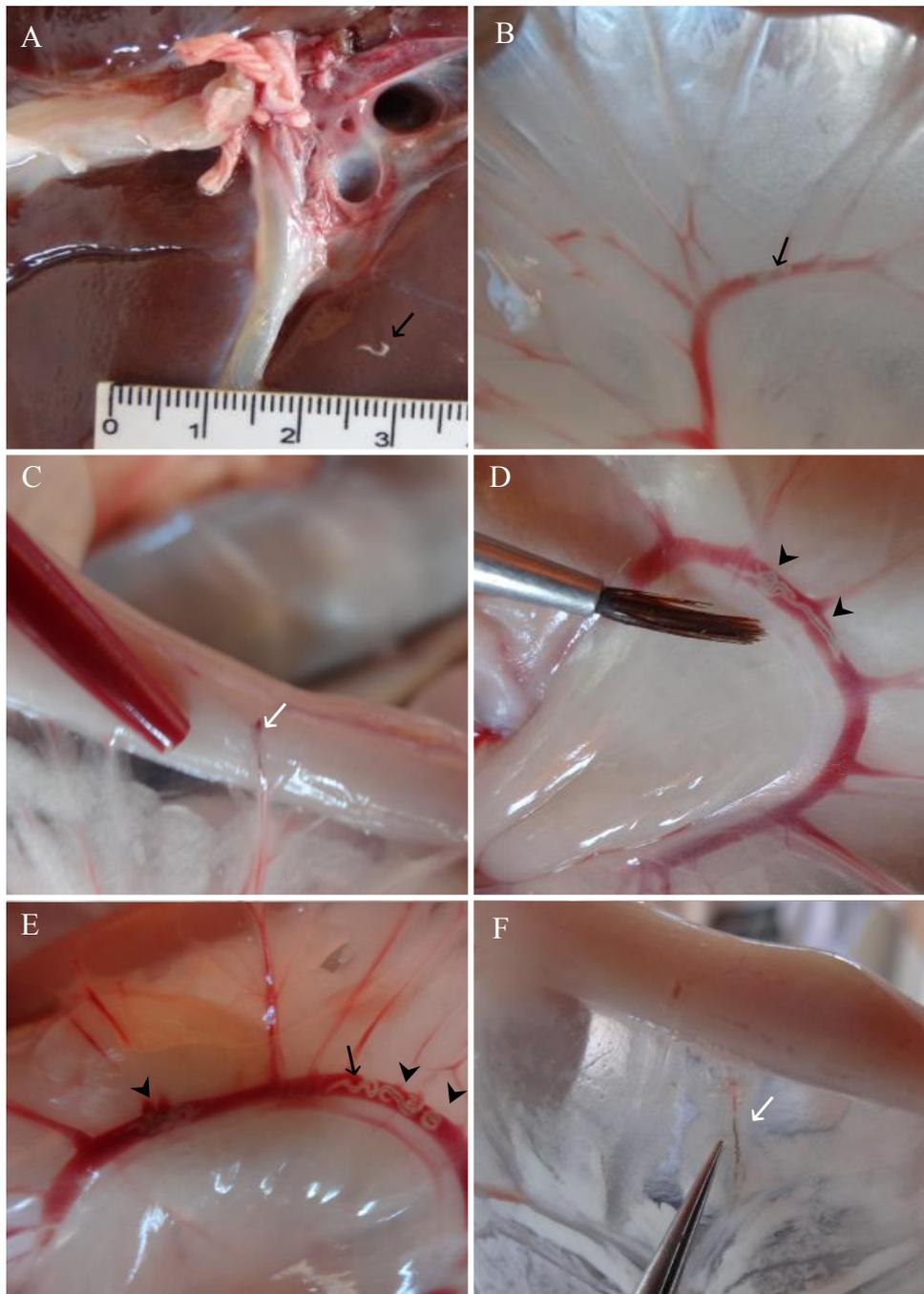


Figura 14: Recuperação de parasitos *Schistosoma mansoni* no fígado e nos vasos mesentéricos de ovinos da raça Santa Inês infectados com 2.000 cercárias. (A) Seta preta- Macho de *Schistosoma mansoni* advindo da veia porta. (B) Seta preta- Macho de *S. mansoni* em vaso mesentérico. (C) Seta branca- Fêmea de *S. mansoni* em vaso mesentérico. (D) Seta - Casais em cópula de *S. mansoni* em vaso mesentérico. (E) Cabeças de seta- casais em cópula de *S. mansoni*; Seta preta- macho de *S. mansoni*. (F) Seta branca- Fêmea de *S. mansoni* em vaso mesentérico.

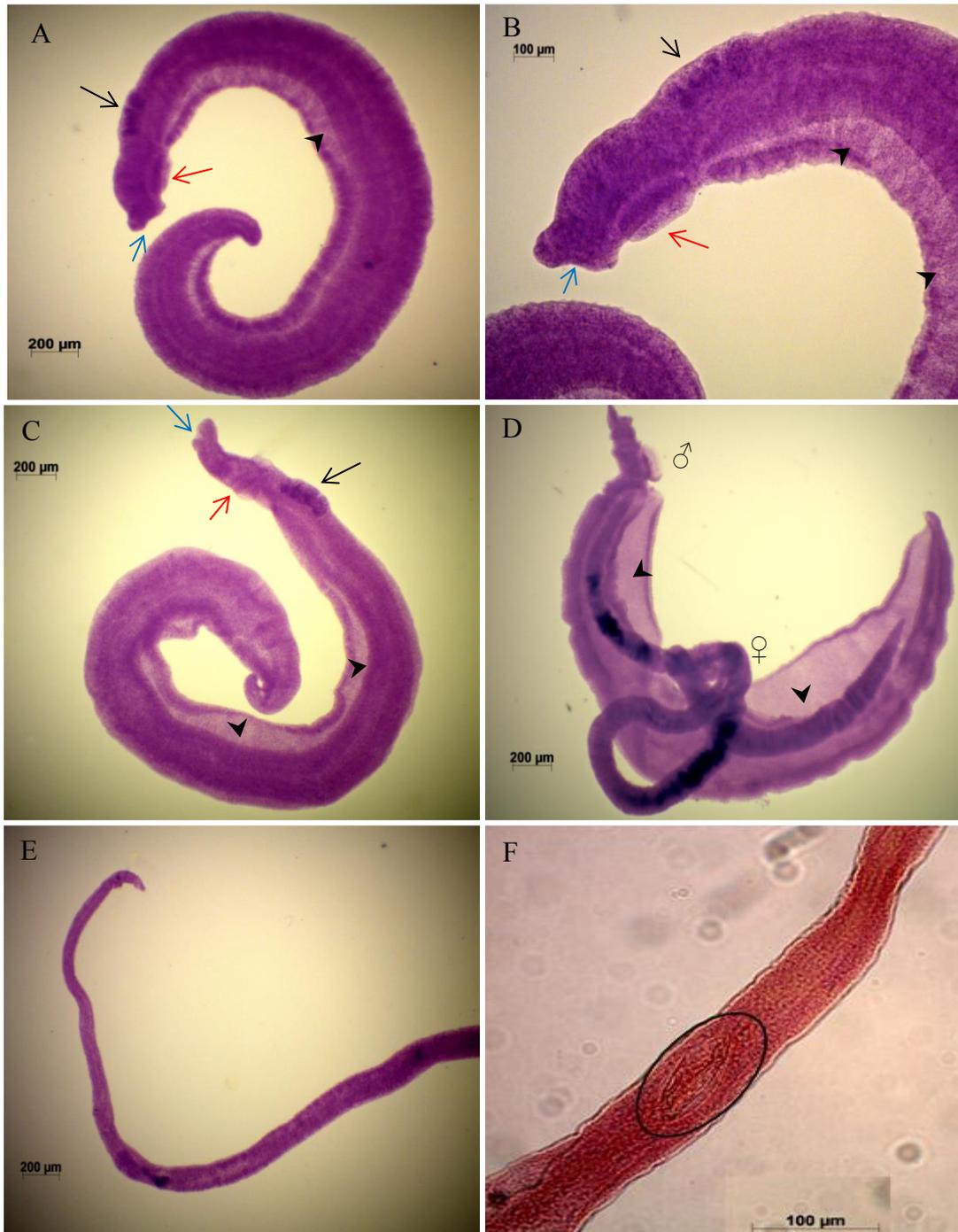


Figura 15: Recuperação de parasitos *Schistosoma mansoni* no fígado e nos vasos mesentéricos de ovinos da raça Santa Inês infectados experimentalmente com 2.000 cercárias por via cutânea. Parasitos fixados com carmim acético.

(A, B e C)- Machos de *S. mansoni*. Setas pretas- testículos; Setas vermelhas- ventosa ventral; Setas azuis- ventosa oral; Cabeça de seta- canal ginecóforo. (D)- Casal em cópula. Símbolo ♂- parasito macho; Símbolo ♀- fêmea; Cabeça de seta- canal ginecóforo. (E)- Fêmea de *S. mansoni*. (F)- Fêmea. linha oval preta a circundar ovo no útero do parasito.

5.4.3 Recuperação de ovos de *Schistosoma mansoni* em órgãos

A técnica de digestão com KOH 5% (Cheever, 1968) foi satisfatória na recuperação de ovos de *S. mansoni* em ovinos infectados, como pode ser observado na Figura 16.

Entretanto, após a digestão dos fragmentos intestinais, houve necessidade seguida da retirada do sobrenadante por cinco vezes, passagem pela penúltima malha da técnica de quatro tamises (200 malhas/polegada- 87 μ m) (Girão e Ueno, 1982) e melhora na visualização dos ovos em microscopia óptica (aumento de 10, 20 e 40X).

Para quantificar os ovos, após sedimentação, cada amostra foi conservada em tubo *Falcon* com formaldeído a 10%, com volume de 10 ml de solução final. No momento da contagem, a solução foi homogeneizada e coletada 200 μ l/amostra em triplicata. Ao terminar a quantificação, foi realizado cálculo para estimar a média no volume final (10 ml) como demonstrado no quadro 3.

Como resultado, a maior quantidade de ovos recuperados foi no ovino 07 com eutanásia aos 255 dpi, com média de 84.000 ovos pela digestão hepática, assim como porção proximal do intestino delgado (4.000), porção média (6.100) e final (10.000). No intestino grosso foi possível obter 33.400 ovos de *S. mansoni*. Todavia, o ovino 06 (eutanásia aos 135 dpi) demonstrou a menor taxa de recuperação pelo mesmo processo, com 2.380 ovos no tecido hepático, 180, 270 e 350 nas porções proximal, média e distal do intestino delgado respectivamente, além de 810 ovos no intestino grosso (Quadro 3).

A segmentação do intestino delgado demonstrou a concentração dos ovos na porção final do órgão. Em dois ovinos (01 e 03) foi constatado maior número de ovos de *S. mansoni* na porção final do intestino delgado se comparado à quantidade relatada no intestino grosso.

Além disso, foram medidos 100 ovos de cada segmento quanto ao comprimento, largura e comprimento do espículo. Como resultado, as variações de comprimento foram entre 83,46 μ m (49,09 μ m/largura e 21,17 μ m/comprimento de espículo) e 147,23 μ m (74,11 μ m/largura e 29,83 μ m/comprimento de espículo), com média de 112,13 μ m/comprimento. Quanto à largura, as mediadas ficaram entre 37 μ m (129,5 μ m/comprimento e 18,44 μ m/comprimento de espículo) e 74,11 μ m (147,23 μ m/comprimento e 29,83 μ m/comprimento de espículo), com média de 49,87 μ m. Por fim, quanto ao comprimento do espículo, as medidas ficaram entre 33,36 μ m (104,25 μ m/comprimento e 48,45 μ m/largura) e 11,7 μ m/comprimento (93,49 μ m/comprimento e 46,9 μ m/largura), com média de 21,36 μ m de comprimento.

Quadro 3: Recuperação de ovos de *Schistosoma mansoni* pela técnica de digestão com KOH a 5%, no fígado e no intestino delgado e grosso de ovinos da raça Santa Inês infectados experimentalmente com 2.000 cercárias.

Animal	Órgão				
	Fígado	ID*proximal	ID* médio	ID* Final	IG*
01	15.000	950	1.050	1.850	1.650
03	4.000	1.300	1.550	3.550	1.150
06	2.380	180	270	350	810
07	84.000	4.000	6.100	10.100	33.400

Legenda: *ID (Intestino delgado). *IG (Intestino grosso)

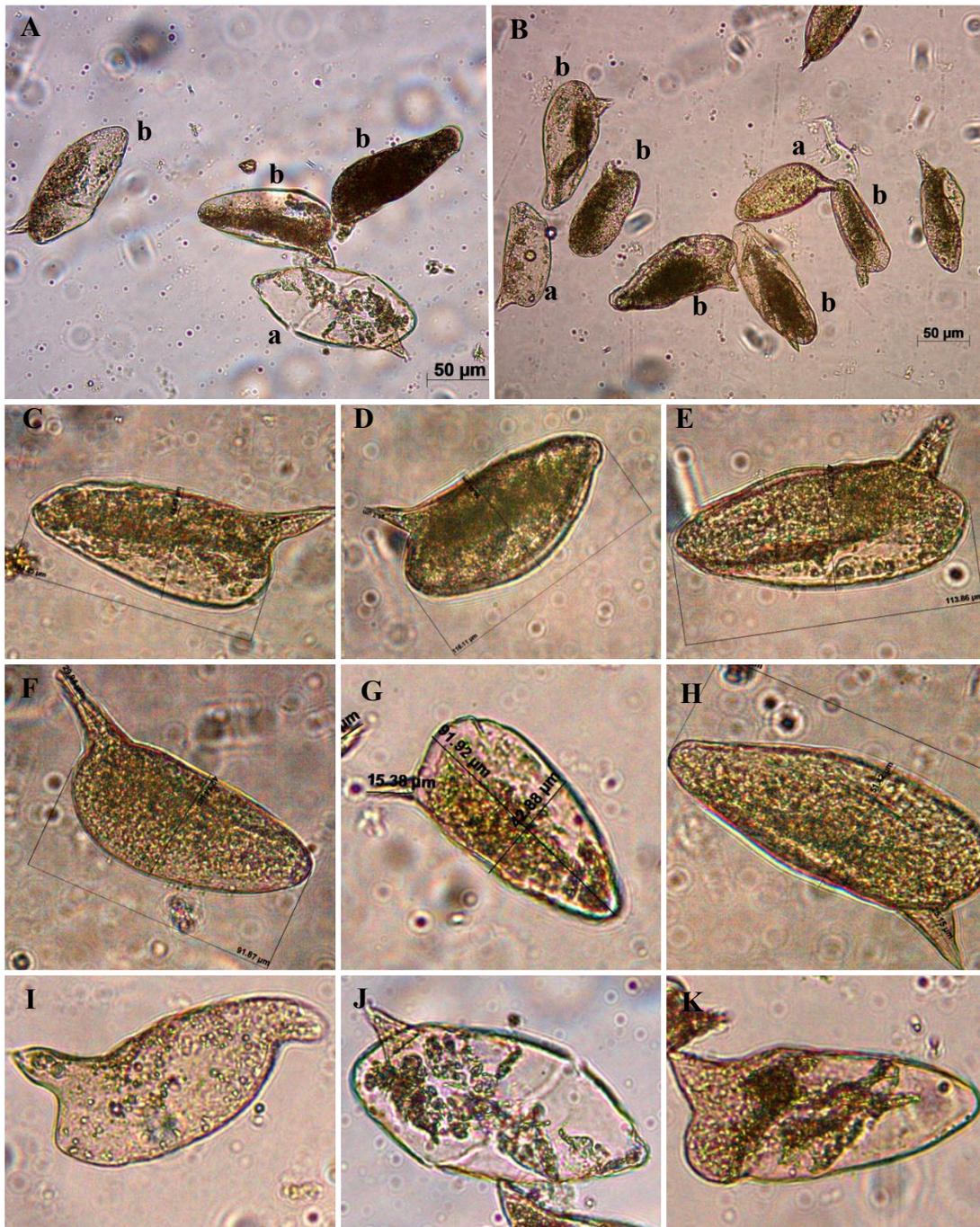


Figura 16: Recuperação dos ovos de *Schistosoma mansoni* no fígado e intestino de ovinos da raça Santa Inês infectados com 2.000 cercárias. (A)- Ovos provenientes de tecido hepático após digestão com KOH 5%; a- casca de ovo após absorção ou eliminação do seu conteúdo, b- ovos hemitransparentes. (B)- Ovos provenientes de intestino grosso após digestão por KOH 5%. Imagens (C, D, E, F, G e H)- ovos hemitransparentes (Aumento de 40x); (I, J e K)- Cascas de ovos após absorção ou eliminação do conteúdo (Aumento 40x).

6. DISCUSSÃO

6.1 Parâmetros clínicos

6.1.1 Avaliação clínica

Os sinais demonstrados ao comparar-se o grupo de animais infectados ao grupo controle foram a perda de peso que ocorreu aos 30 e 60 dpi e a avaliação do escore corporal que ocorreu aos 60 dpi. Além disso, os animais infectados perderam massa corporal do dia 15 (22kg) aos 75 dpi (19,88kg), obtendo ganho de peso compensatório a partir dos 105 dpi (22kg); ao final do estudo, a diferença de peso entre animais controles e infectados era de 1,8 kg. Essas evidências diferem em parte dos estudos realizados por Adam e Magzoub (1976), em que, dois ovinos do deserto sudanês infectados por 1.500 cercárias de *S. mansoni* desenvolveram além da perda de peso, sintomatologia clínica característica, como anorexia, fraqueza, diarreia e perda de lã; sinais também relatados na infecção da espécie caprina, em que dois cabritos de cinco a seis meses de idade e duas cabras de dois a três anos de idade foram infectados com 1.500 e 3.000 cercárias de *S. mansoni*, respectivamente (Adam e Magzoub, 1977).

Esses achados corroboram que diferenças da resposta imune e clínica à infecção por *S. mansoni* em ruminantes envolvem não somente aspectos relacionados à espécie, como também idade e raça; fato comprovado no estudo realizado por Modena *et al.* (1993) em que bovinos de raça mestiça (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) e apenas holandesa (*Bos taurus taurus*) infectados experimentalmente por *S. mansoni*, mostraram diferenças em relação à susceptibilidade quando comparada além da raça, a idade; aos quais, bezerros holandeses foram mais susceptíveis à infecção se comparado aos bezerros mestiços, dos adultos holandeses e adultos mestiços, respectivamente.

Em ressalva às diferenças nos sinais clínicos ocasionados pela infecção por *S. mansoni* na comparação entre os estudos mencionados, outras espécies de *Schistosoma* também causam danos físicos aos animais domésticos que diferem em espécie, idade e carga parasitária, dentre eles, o *Schistosoma mattheei*, trematódeo de ovinos que podem infectar bovídeos e caprídeos. No estudo realizado por Malherbe (1970) infectaram ovelhas das raças Merino e Dorper com distinto número de cercárias de *S. mattheei* (2.000 a 90.000), observou-se que os ovinos com menor número de parasitos (2.000 a 16.000 cercárias) não apresentaram sinais clínicos causados pela infecção e ovinos com maior exposição (30.000 a 90.000 cercárias) demonstraram sinais clínicos como aumento de estertores pulmonares, aumento de

frequência respiratória e cardíaca, além de diarreia hemorrágica. A mesma resposta branda foi observada por Lawrence (1980), ao qual, infectou cordeiros da raça Dorper com 3.000 cercárias de *S. mattheei* e o único sinal clínico observado da sétima até a décima quinta semana foi a redução de apetite se comparado ao grupo controle. Após essas semanas os ovinos recuperaram-se, mas o desempenho ainda ficou abaixo dos animais livres da infecção. No experimento de McCully e Kruger (1969), onde foram infectadas ovelhas com 500 a 90.000 cercárias de *S. mattheei*, foi observado que nos animais expostos a maior carga parasitária, palidez de mucosas, anemia, fraqueza, inapetência, muco nas fezes, diarreia fétida e sanguinolenta, mas no trabalho, não se menciona a idade e raça dos espécimes.

Observa-se que as variáveis de FR/min, FC/min e TR têm no dia 0 e 15 valores superiores nos dois grupos se comparado ao restante do período experimental. Essa diferença se justifica ao estresse provocado pela manipulação dos ovinos com consequente aumento do metabolismo, pois não estavam condicionados a tal ação, o que acarreta aumento da FC/min, FR/min e TR. Devido a esses fatores, foi preconizado a realocação dos animais para o curral próximo a baia de procedimentos e no dia seguinte pela manhã, os ovinos eram encaminhados à baia com preconização de intervalo de uma hora antecedente ao início da avaliação clínica com água *ad libitum*. Após os procedimentos que duravam em média duas horas, os animais recebiam ainda no local, folhas de amora e farelo de milho ou caroço de algodão como forma de recompensa e afirmação do condicionamento no manejo mais confortável. Essa ação proporcionou ao longo do trabalho, menor estresse aos animais e menor esforço durante a manipulação dos mesmos, devido ao condicionamento animal.

Aos 30 dpi foi relatado no experimento, fezes amorfas e com excesso de muco em três ovinos infectados (ovinos 01, 03 e 06); aos 75 dpi em dois animais infectados (ovinos 01 e 07) e um controle; aos 255 dpi dois ovinos infectados (03 e 07) e um controle. Nos estudos realizados na infecção por parasitos do gênero *Schistosoma*, a diarreia com presença de sangue geralmente é paralela ao início da eliminação de ovos nas fezes dos animais, assim como a presença de muco em excesso e persiste até que o animal adquira uma resposta imune satisfatória à presença do parasito e consequente controle da infecção (Malherbe, 1970; Adam e Magzoub, 1976; Saad *et al.*, 1984; Van Wik, Rensburg e Heitmann, 1997). Embora não foram observados ovos ou miracídios provenientes das amostras fecais dos ovinos infectados, os sinais clínicos como perda de peso, queda no escore corporal e alguns intervalos com visualização de fezes amorfas demonstram que a maior intensidade da esquistossomose

mansoni nesses animais ocorre na fase aguda da infecção, assim como observado em humanos.

6.1.2 Perfil hematológico

No estudo, constataram-se valores menores na contagem total de hemácias mais pronunciado aos 60 dpi com diferença estatisticamente significativa, mas estendendo-se até aos 105 dpi. Concomitante com a queda na população de células vermelhas foi detectado também a diminuição de hematócrito, hemoglobina e plaquetas, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa ao comparar os grupos, inferindo, dessa forma, os intervalos que compreendem a fase aguda da infecção e início da oviposição das fêmeas de *S. mansoni* nesses animais como o período que ocorreu maiores diferenças clínicas e hematológicas devido ao parasitismo ao comparar o grupo Controle. Essa característica corrobora com o experimento de Saeed e Nelson (1974), em que infectaram quatro cordeiros da raça Suffolk-Welsh-Border com 20.000 cercárias de *S. mansoni*; os animais apresentaram tendência à anemia. Já no experimento com bezerros mestiços e holandeses infectados por *S. mansoni* a contagem de hemácias diminuiu gradualmente durante o período experimental (10 semanas), sendo que a menor contagem ficou no grupo dos animais de sangue puro europeu, mas o decréscimo não foi suficiente para estabelecer a anemia nesses animais (Modena *et al.*, 1994). Já nas infecções por *S. mansoni* em caprinos, não foi realizada avaliação hematológica, entretanto, as mucosas dos animais mostraram palidez, principalmente com a progressão da infecção (próximo aos 200 dpi) (Adam e Magzoub, 1977).

Saad *et al.* (1984) observaram padrão de anemia decorrente da infecção de cabras por *S. bovis* (4.000 cercárias), com drástica queda na contagem de hemácias (anemia normocítica e normocrômica) da quarta à décima semana e recuperação com estabilidade do quadro após esse período. Esses resultados diferiram do presente estudo, em que a queda inicial de hemácias não se manteve. Já na infecção de ovelhas com *S. mattheei* (3.000 cercárias) foi observado anemia nos animais infectados mais tardiamente, a partir da 25^o semana após infecção, com estabilização do quadro, mas, distinto do resultado encontrado no estudo presente, não houve recuperação para a normalidade (Lawrence, 1980).

A baixa na contagem total de hemácias no presente experimento aos 60 dpi pode ser justificada pelo início da espoliação sanguínea em maior quantidade pelos parasitos adultos de *S. mansoni* e, a estabilização do quadro, assim como a recuperação dos valores, respaldada na resposta imunológica equilibrada e eficiente perante a infecção, visto que houve diminuição

intermitente na contagem de hemácias no restante do estudo ao se comparar os ovinos controles, mas não o suficiente para diferença estatística significativa entre os grupos.

6.1.3 Contagem total e diferencial de leucócitos

No experimento foi observada diferença estatisticamente significativa na contagem total de leucócitos e contagem diferencial de neutrófilos ao comparar o grupo de ovinos controles e infectados, aos 30 e 60 dpi. Pôde ser constatada diferença estatisticamente significativa na contagem diferencial de neutrófilos bastonetes aos 45 dpi. O aumento na contagem de neutrófilos nos ovinos infectados pode ser justificado na fase inicial da infecção (30 dpi) pelos estímulos quimiotáxicos derivados de linfócitos T sensibilizados, como também do sistema complemento, sendo a função dos neutrófilos dependente de processo celular imune e humoral, atuando de forma dependente, com consequente reação a produtos secretados/excretados dos esquistossômulos, como também da destruição desses parasitos (Vadas *et al.*, 1980; Atta *et al.*, 1981) e, mais tardiamente, pela reação inicial aos produtos secretados/excretados dos ovos de *S. mansoni* e do parasito adulto.

A partir de 75 até os 195 dpi (exceto o intervalo de 165 dpi) foi observada diferença estatisticamente significativa na contagem diferencial de eosinófilos no sangue periférico no grupo infectado se comparado ao grupo controle, mantendo-se reagente no decorrer da infecção crônica. No estudo realizado por Modena *et al.* (1994), também foi observada eosinofília em bovinos infectados experimentalmente por *S. mansoni*, entretanto, com a infecção mais tardia, dos 290 aos 300 dpi. Outros estudos também corroboram com o resultado obtido, como a infecção de ovinos por *S. mattheei* (Lawrence, 1980); e infecção por *S. mansoni* em cabras e ovelhas descritas por Saad *et al.* (1984). Alguns estudos relataram que o antígeno solúvel do ovo sensibiliza linfócitos T, capaz de promover a quimiotaxia de eosinófilos advinda de um tipo de linfocina (estimulação promotora de eosinófilos) e que a destruição dos ovos de *S. mansoni* depende diretamente da antigenicidade e especificidade da célula efetora (Colley, 1972 in Atta *et al.*, 1981; Capron e Capron, 1992; Leal *et al.*, 2006; Moreau e Chauvin, 2010). Esses estudos corroboram com os achados nesse experimento, visto que a cinética de IgG revelou aumento aos 75 dpi e se manteve alta durante o todo o estudo (ver resposta imune humoral), além disso, foram encontrados poucos granulomas no fígado dos ovinos, tendo em vista uma resposta imune inata desses animais perante a infecção por *S. mansoni*. Em contraste, no estudo realizado por Bastos *et al.* (1985), com infecção experimental de roedores da espécie *Holochilus brasiliensis nanus* revelou eosinofília apenas

nos animais naturalmente infectados capturados em área endêmica para esquistossomose mansoni. Porém, o experimento foi realizado a curto prazo com 56 dias de duração, de forma a indicar que o aumento de eosinófilos tem correlação positiva com a cronicidade da infecção até a diminuição da população ou eliminação dos parasitos pelo hospedeiro vertebrado.

6.2.2 Resposta imune humoral- Imunoglobulina G sérica

Até o presente, não encontramos dados sobre a resposta imune humoral baseado na titulação de IgG em plasma de ovinos infectados experimentalmente por *S. mansoni* e com utilização de antígeno de parasito adulto (SWAP).

A cinética de IgG na observação da resposta imune nos ovinos infectados, na diluição 1:200 demonstrou aumento a partir de 45 dpi e manteve-se até o final do experimento no grupo de ovinos infectados, com diferença estatisticamente significativa ao comparar-se ao grupo controle. Já na diluição 1:400, foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de IgG a partir de 45 dpi até 135 dpi. Após esse período, os níveis continuaram maiores na comparação com o grupo controle, mas sem diferença estatisticamente significativa. Esses achados evidenciam que a elevação de IgG no plasma do grupo infectado está relacionada diretamente aos antígenos circulantes do parasito adulto e, devido a essa alta afinidade antígeno-anticorpo, a metodologia pode ser utilizada como marcador desde o final da fase aguda pré-postural à fase crônica na diluição 1:200 devido a sua tendência à cronicidade. Todavia, na diluição 1:400 os níveis de IgG que reagem a antígenos de parasito adulto não são mais detectáveis até aos 165 dpi se comparado estatisticamente ao grupo controle. Sobre as semelhanças nas detecções de IgG nas duas diluições, pode-se inferir que a resposta imune humoral mais intensa se dá na fase aguda pós postural (concomitante com os achados clínicos e hematológicos), visto que os valores em relação à diluição do plasma 1:400 mantêm-se nos períodos iniciais paralela à diluição 1:200, mas decaem na metade final do experimento (165 a 255 dpi).

O único estudo comparativo na infecção de ruminantes encontrado foi o estudo realizado por Lopes (2009) com infecção de bezerros mestiços por *S. mansoni* (10.000 cercárias), com preconização da detecção de anticorpos anti-antígeno SWAP no plasma dos animais em dois intervalos, aos 46 e 126 dpi. Como resultado, não houve diferença ao comparar o dia 0 com os intervalos analisados; em ressalva, a diluição utilizada foi de 1:50 e 1:100.

6.3 Parâmetros parasitológicos

6.3.1 Diagnóstico da infecção por métodos diretos

Somente a utilização do exame parasitológico direto de fezes na detecção de ovos de *S. mansoni*, não foi eficaz em confirmar a infecção dos ovinos da raça Santa Inês pelo parasito, assim como os métodos de eclosão de miracídios pela técnica de *Chaia et al.* (1968) e *Jurberg et al.* (2008). Á princípio, se atentou para a possibilidade na dificuldade de visualização dos ovos e miracídios, com conseqüente resultado falso negativo, devido a grande quantidade de amostras, fibras vegetais e coloração turva do sedimento decorrente da clorofila proveniente das fibras; mesmo relato encontrado no experimento com utilização de bovinos mestiços, feito por *Lopes* (2009).

Entretanto, com a utilização da técnica de quatro tamises modificada (*Girão e Ueno*, 1982) foi possível obter maior visibilidade da amostra, com fortes indícios de que os ovinos infectados não eliminaram ovos após a confirmação pelo controle positivo (amostra de fezes positivas de camundongo misturadas a fezes de ovino livre da infecção) e observação dos ovos e miracídios de *S. mansoni* nas técnicas relatadas.

Não foi encontrada na literatura referências sobre o uso da técnica de *Girão e Ueno* (1982), para diagnóstico da infecção por *S. mansoni* em ruminantes e, ainda que os animais do experimento não tenham liberado ovos, esse método diagnóstico pode ser utilizado provavelmente para bovinos infectados, em que é possível o encontro de ovos nas amostras fecais, como relatado por *Coelho et al.* (1982) e *Modena et al.* (1993). Todavia, ainda que o resultado das análises fecais tenha sido negativo para ovinos da raça Santa Inês mais estudos necessitam ser realizados com essa raça uma vez que há relatos na literatura de outros ovinos em que foram observados ovos de *S. mansoni*, como as raças européias Suffolk-Welsh-Border (*Saeed e Nelson*, 1974) e a raça Border-Leicester (*Preston, Nelson e Saeed*, 1972), sendo a primeira com presença de descendentes e a segunda com raça pura criadas no Brasil, em especial, na região Sul e locais serranos de clima ameno na região Sudeste.

Outro aspecto relevante desse estudo é o uso de curetagem de mucosa retal, sendo o único método capaz de detectar *ante mortem* a infecção dos ovinos da raça Santa Inês por *S. mansoni*, mesmo resultado descrito na infecção de bezerros mestiços por *Lopes* (2009) e concomitante com o exame parasitológico de fezes como descrito por *Modena* (1989). Entretanto, no presente estudo com ovinos Santa Inês, em nenhuma análise de mucosa retal foram observados ovos viáveis do parasito, apenas cascas, ovos hemitransparentes e com material granuloso em seu interior, de forma a não ser possível completar o ciclo com

infecção de moluscos do gênero *Biomphalaria* sp., mesma característica observada nos ovinos do deserto sudanês (Adam e Magzoub, 1976).

Deve-se ressaltar que, ainda que a curetagem de mucosa retal tenha sido a técnica mais sensível no presente experimento, por apresentar resultado parasitológico definitivo em poucos minutos e tornar desnecessário exames de fezes sucessivos e trabalhosos para fins de apenas confirmar a infecção. Todavia, o método é invasivo e com frequência leva à hemorragia retal e predispõe à infecção bacteriana secundária.

6.3.3 Método indireto- Detecção de antígeno na urina

O exame indireto de detecção de antígeno catódico circulante na urina (POC-CCA-Point Of Care-Circulating Cathodic Antigen) realizado nos ovinos durante os intervalos de 135 e 165 dpi não foi satisfatório para o diagnóstico da infecção. Em apenas um intervalo pôde ser observado traço leve em um dos cassetes do ovino 01 e do ovino 06 e em dois cassetes com traço moderado e leve no ovino 03 no intervalo de 135 dpi; no último intervalo do estudo, todos os animais foram negativos ao exame. Entretanto, essa técnica para diagnóstico da infecção por *S. mansoni* em ruminantes até então é única, pois não foi encontrados relatos na literatura que abordassem o teste na urina desses animais.

Ressalta-se que a sensibilidade do teste está sendo discutida no diagnóstico do parasitismo por *S. mansoni* em humanos, sendo que em áreas de alta e média endemicidade o teste aponta sensibilidade de 83% em indivíduos onde foi possível observar ovos nas fezes (Stothard *et al.*, 2006) a 89, 1% , mostrando ser mais sensível ao se comparar com o método de Kato Katz (Erko *et al.*, 2013), sendo preconizada como auxiliar no diagnóstico da infecção. Essas ações não podem ser comparadas ao estudo da infecção nos ovinos da raça Santa Inês, além disso, nas amostras fecais não foram visualizados ovos ou miracídeos do parasito, ainda que tenham sido encontrados espécimes fêmeas de *S. mansoni* em todos os animais infectados e ovos no fígado e intestinos, todavia, inviáveis.

Dessa forma, a baixa sensibilidade do POC-CCA na utilização de urina proveniente de ovinos infectados da raça Santa Inês pode ser respaldada pelo baixo parasitismo desses animais, o que pressupõe que a quantidade de CCA não tenha sido suficiente para marcar com alto grau de pigmentação a banda positiva do teste. Entretanto, se analisarmos a quantidade de parasitos recuperados nos ovinos, o animal 07 foi o que apresentou maior carga (109 espécimes), mas não foi detectado traço CCA em nenhuma amostra analisada.

6.4 Aspectos *post mortem*

6.4.1 Patologia

Das lesões descritas no fígado e pulmões dos ovinos infectados, chamam atenção dois aspectos: (a) a pouca frequência de granulomas típicos formados em torno de ovos de *S. mansoni* e (b) a frequente observação de lesões focais, esparsas, nodulares, formadas por granulomas extensos, contendo material amorfo envolto por exsudato de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células gigantes multinucleadas e graus variáveis de neoformação conjuntivo vascular.

A pouca frequência de granulomas em torno dos ovos de *S. mansoni* deve ser consequência do fato de a infecção, embora tenha se estabelecido, não foi acompanhada de estabilização dos parasitos; a provável resistência imposta pelo hospedeiro, embora tenha sido insuficiente para abortar a infecção, foi eficiente em reduzir a eliminação e viabilidade dos ovos. Por essa razão, a quantidade de ovos produzida diariamente foi pequena, visto que também não foram observados nas fezes. Os poucos granulomas observados com restos de cascas ovos e com miracídios são o testemunho morfológico de que a infecção se estabeleceu, mas com pequena quantidade de ovos eliminados pelas fêmeas, constatado pela não visualização de ovos na mucosa intestinal e nas amostras fecais analisadas.

As lesões granulomatosas observadas, esparsas no fígado, podem ser interpretadas como resultante da embolização de *S. mansoni* originados das veias mesentéricas, mesmo que não tenha sido possível, nas diversas lâminas examinadas evidenciar nenhum granuloma com estruturas que lembrassem parasitos adultos. O centro dos granulomas era sempre ocupado por material amorfo, interpretado como sendo restos de *S. mansoni* embolizados, como será discutido adiante. A resistência imposta pelos ovinos da raça santa Inês ao parasito não só reduziu a produção e eliminação dos ovos, como também tornou o ambiente das veias mesentéricas pouco favoráveis aos espécimes de *S. mansoni* adultos que, embora tenham conseguido chegar à maturidade sexual e acasalamento, tiveram a fecundidade reduzida. Provavelmente mecanismos imunitários levaram ao enfraquecimento e deslocamento dos parasitos da parede vascular e seu realocamento pela veia mesentérica até a veia porta, por onde se alojaram no fígado, ficando retidos nos ramos portais menores. Esses parasitos embolizados não só induziram isquemia parcial de parte do tecido hepático, como também induziram forte reação inflamatória ao seu redor. O exsudato inflamatório rico em eosinófilos, neutrófilos e macrófagos provavelmente contribuiu para a morte dos parasitos já agredidos pelo ambiente hipóxico que criaram ao obstruir o ramo portal. Os parasitos mortos sofreram

lise por autólise de seus tecidos e por ação de produtos liberados por exsudato inflamatório, resultando no material amorfo observado na maioria dos granulomas vistos no fígado e nos pulmões. A autólise sofrida pelos parasitos e a possível ação de hidrolases dos leucócitos em torno dos mesmos levaram a sua total destruição, de forma a impossibilitar a observação de estrutura viável que pudesse identificá-los. Como os ovinos da raça Santa Inês foram sacrificados aos 135 dpi (ovino 06) e aos 255 dpi (ovinos 01, 03 e 07) e a embolização ocorreu dias ou até mesmo semanas antes da eutanásia, não se observou parasitos adultos recentemente embolizados. É possível que a amostra examinada no estudo histológico-fragmentos suspeitos por terem lesões macroscopicamente evidenciáveis- tenha sido insuficiente para surpreender *S. mansoni* embolizados. Estes possivelmente existiam porque foram recuperados parasitos adultos do fígado em todos os ovinos eutanasiados, em exceção ao ovino 05 que morreu aos 45dpi e teve a avaliação patológica, assim como a recuperação dos parasitos inviabilizados. Por essas considerações, embora não tenha sido possível a identificação precisa dos parasitos, foi inferida que os grandes granulomas observados foram consequência de reação em torno de espécimes de *S. mansoni* embolizados para o fígado, fato que pode ser reforçado por observações feitas em infecção pelo parasito em outros modelos experimentais e em humanos como será discutido a seguir.

Em experimento realizado por Saeed e Nelson (1974) que infectaram ovinos da raça Suffolk-Wesh-Border com 20.000 cercárias de *S. mansoni* foram observados parasitos mortos circundados por reações inflamatórias no fígado dos ovinos sacrificados aos 100 e 175 dpi. No experimento aqui relatado, os ovinos da raça Santa Inês foram sacrificados em períodos mais tardios após a infecção: um aos 135 dpi (06) e três aos 255 dpi (01,03 e 07). Além disso, a carga parasitária no presente experimento com ovinos da raça Santa Inês foi de 2.000 (quantidade 10 vezes menor que no estudo de Saeed e Nelson, 1974).

Outro argumento que reforça a idéia de admitir que os granulomas se formaram em torno de parasitos embolizados é a semelhança na histopatologia com granulomas em torno de *S. mansoni* adultos relatados por Saeed e Nelson (1974) e por Adam e Magzoub (1977). Esses últimos autores observaram em caprinos infectados, granulomas em torno de parasitos no fígado, além de terem observado ovos associados a grande reação inflamatória na mucosa intestinal. Essa presença de ovos na mucosa intestinal não foi observada no experimento aqui relatado, provavelmente em função dos animais terem sido eutanasiados mais tardiamente quando os mecanismos de auto cura já estariam instalados, levando à redução da eliminação de ovos. Além disso, os caprinos utilizados no estudo de Adam e Magzoub demonstraram ser

mais permissivos à infecção devido à alta recuperação de parasitos nesses animais e pela eliminação de ovos nas fezes, mais evidenciada nos animais jovens (36%) e nos adultos (14 e 21%); com carga parasitária infectante de 1.500 e 3.000 cercárias, respectivamente. Entretanto, os cabritos (cinco e seis meses) não resistiram à infecção e morreram aos 238 e 241 dpi, o que correlaciona o fator da idade com a gravidade da infecção por *S. mansoni*.

Em humanos infectados, especialmente na fase aguda, mas também na fase crônica da infecção é relatado o encontro de parasitos adultos embolizados no fígado, com formação de granulomas grandes, nos quais podiam ser observados restos do parasito ao lado de granulomas, aos quais estavam necrosados e sofrendo autólise, com formação de lesões características semelhantes às descritas nos ovinos da raça Santa Inês, ou com formação de lesões necróticas que eram infiltradas por leucócitos, inclusive eosinófilos, evoluindo para fibrose (Menezes, 1976). Também em bovinos infectados foi relatada presença de espécimes de *S. mansoni* dentro dos espaços porta, com reação inflamatória em torno de parasitos degenerados densamente infiltrados por leucócitos, incluindo eosinófilos (Modena, 1989).

Os granulomas pulmonares observados no ovino 03, semelhantes aos observados no fígado (área central homogênea, infiltrada na periferia por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e células gigantes, com fibrose periférica) seriam também induzidos por parasitos embolizados, decorrente de migração errática, que podem colonizar outros segmentos do sistema venoso, inclusive permanecer nos pulmões (Carvalho, Coelho e Lenzi, 2008).

As demais lesões observadas nos fígados dos quatro ovinos da raça Santa Inês necropsiados eram representados por infiltrados portais perivasculares, com frequência de eosinófilos e neutrófilos, comprometendo a parede de segmentos da veia porta ou de paredes da artéria hepática. Essas lesões eram observadas próximas às lesões granulomatosas extensas, correspondentes a espécimes de *S. mansoni* embolizados. Não há explicação satisfatória para essas lesões. É possível que sejam decorrentes da deposição de fragmentos dos parasitos e seus antígenos nas paredes vasculares, especialmente dos vasos portais, o que pode ter levado à formação de imunocomplexos no local, com consequente resposta inflamatória.

Em resumo, as lesões observadas nos fígados indicam que os ovinos da raça Santa Inês têm capacidade de infecção por *S. mansoni*, com desenvolvimento pleno decorrente da maturação dos parasitos e encontro de ovos nos tecidos. As escassas lesões observadas nos fígados dos quatro ovinos necropsiados -raros granulomas em torno de ovos do parasito e esparsas lesões granulomatosas focais em volta de parasitos mortos- observados aos 135 e

255 dpi demonstraram que os ovinos da raça Santa Inês desenvolveram mecanismo de auto cura, mas de forma que a infecção persistisse com fêmeas fecundadas gerando e eliminando ovos. Ao contrário, a resistência se manifesta pela não observação de ovos nas fezes e baixa recuperação de parasitos no fígado.

Do ponto de vista da cadeia de ovinocultura, aspectos macroscópicos de órgãos como pulmão e fígado observados apontaram poucas lesões focais advindas da infecção por *S. mansoni* nos ovinos da raça Santa Inês infectados. Porém, podem levar a perda econômica na criação ovina, pois essas lesões comprometem o aproveitamento das vísceras no frigorífico e, até mesmo, o descarte das mesmas.

6.4.2 *Schistosoma mansoni* e ovos

Os parasitos machos e fêmeas recuperados com a técnica de perfusão das vísceras e pela visualização direta dos vasos mesentéricos, mostraram-se menores se comparados as medidas de *S. mansoni* encontrados em humanos no estudo de Kastner; et al (1975), em ovinos do deserto sudanês (Adam e Magzoub, 1976), na espécie bovina (Mayaudon e Power, 1970) e tamanho assemelhado ao encontrado na infecção de camundongos em infecção bissexual (Zanotti, Magalhães e Piedrabuena, 1982).

Além disso, houve heterogeneidade ao comparar a carga parasitária dentro do grupo de ovinos Santa Inês infectados, sendo o maior número no ovino 07 (109 parasitos- 5,45%) e o menor, no ovino 05 (9 parasitos- 0,45%), entretanto, o baixo número pode ser justificado pelo fato das vísceras terem sido congeladas na propriedade rural onde o animal veio à óbito; ainda assim, o ovino 03 (em que foi possível a perfusão) a carga obtida foi de 12 parasitos (0,6%), porém, nesse animal houve dificuldade na recuperação dos parasitos devido a alta quantidade de sangue nos vasos mesentéricos. Esses resultados contrastam com outras raças de ovinos, como Suffolk-Wesh-Border infectados por *S. mansoni* em que foi possível a recuperação de 617 (3%) a 1.444 (7,5%) relatado por Saeed e Nelson (1974) e surpreendentemente, em duas ovelhas do deserto sudanês, com quantificação de 700 (41%) e 400 (30%) parasitos, porém, mesmo com parasitismo severo, não foram observados ovos nas fezes desses animais (Adam e Magzoub). Os resultados aqui abordados em relação à taxa de recuperação dos parasitos se contrapõem também aos estudos realizados na espécie bovina com animais mestiços (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), em que foi possível obter o máximo de 4.497 (7,3) e mínimo de 1.050 (3,5%) parasitos (Coelho *et al.*, 1982) e no estudo de Modena (1989) que relatou, além de maior carga parasitária, diferenças entre idade e raça

dos hospedeiros, sendo maior em bovinos jovens de raça européia (*Bos taurus taurus*) (17 a 32%), jovens mestiços (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) (4 a 8%), adultos europeus (0,8 a 4%) e adultos mestiços (0,4 a 5%), respectivamente. A diferença na carga parasitária relacionada a idade também é afirmada por Adam e Magzoub (1977) em cabras infectadas por *S. mansoni*, nesses ruminantes houve maior desenvolvimento e sobrevivência dos parasitos nos animais jovens (36%) se comparado a cabras adultas (14% a 21%).

Todavia, quantificação parasitos em cópula provavelmente foi subestimada, pois ao realizar a perfusão com salina, os espécimes continuam movimentam-se vigorosamente no meio, nesse período, muitas fêmeas saem do canal ginecórico do macho, visto que muitos casais foram visualizados ainda dentro dos vasos mesentéricos (Figuras 14 D e E).

Em relação à recuperação de ovos do parasito pela técnica de digestão por KOH 5%, não foram observados ovos viáveis no fígado e intestinos dos ovinos da raça Santa Inês, apenas cascas, ovos hemitransparentes e com material granuloso em seu interior, contrastando com os achados na espécie bovina, onde foi possível visualizar ovos em diferentes estádios de desenvolvimento, maduros, mortos e cascas, relatados por Modena (1989).

Sobretudo, ao observarmos parasitos em tamanho menor se comparados aos recuperados em outros ruminantes como demonstrado por Mayaudon e Power (1970) em que os parasitos medidos tiveram média de 10mm de comprimento, a ausência de ovos viáveis nas fezes e na digestão do fígado e intestinos desses animais por KOH 5% e pelo fato dos ovinos demonstrarem pouca sintomatologia clínica e lesões focais nos órgãos, sugere fortemente que esses animais desenvolveram ao longo da infecção, um mecanismo de auto-cura, corroborado por Saeed e Nelson (1974).

Nesse aspecto, as análises e resultados obtidos com a infecção de ovinos da raça Santa Inês, leva a entender que esses animais não demonstram potencialidade para manter o ciclo na natureza, diferenciando dos resultados obtidos com a espécie bovina, realizados por Coelho *et al.* (1982) e Modena *et al.* (1993), assim como no estudo que utilizou ovinos da raça Border-Leicester (Preston, Nelson e Saeed, 1972), ovinos da raça Suffolk-Wesh-Border, realizado por Saeed e Nelson (1974), e em cabras (Adam e Magzoub, 1977).

Entretanto, deve-se enfatizar que muitos fatores podem contribuir para a susceptibilidade de uma espécie animal ao parasitismo por *S. mansoni*, como por exemplo, a condição experimental a qual os animais foram mantidos, como manejo, carga parasitária, idade, raça e tempo de experimento, podendo diferenciar da situação real nas áreas endêmicas

nas quais, o risco de infecção e reinfecções passam praticamente por todo o tempo de vida do animal em diferentes realidades (Modena, 1993).

Durante o experimento, ao observar o comportamento do rebanho ovino à campo, pode-se notar que diferentemente de búfalos e bovinos, respectivamente, esses animais tem pouco contato direto com coleções d'água, em ressalva para ingestão. Entretanto, como na região do cerrado o clima seco impõe escassez de pastagens naturais para alimentação, os ovinos adentram em locais onde possam encontrar forragens verdes e fartas, como alagadiços, beiras de córregos e lagoas. Dessa forma, pode-se inferir que há risco de infecção para ovinos da raça Santa Inês em áreas endêmicas, uma vez que o *S. mansoni* tenha possibilidade de exercer seu potencial biótico (Figura 17), sendo as áreas alagadas para pastagens de ruminantes já consideradas como importante fator de risco para infecção por *Fasciola hepatica* nas regiões sul e sudeste brasileiras (Martins *et al.*, 2014; Bennema *et al.*, 2014).



Figura 17: A- ovinos em local alagadiço em extensão à lagoa para pastejo de forragens (Notar a falta de pasto para os animais à esquerda e forragens em local alagadiço ao fundo). B- ovino ingerindo água em beira de lagoa com os membros em contato direto com meio aquático.

7. CONCLUSÕES

-Ovinos da raça Santa Inês são suscetíveis à infecção por *S. mansoni*, mas não têm importância epidemiológica na transmissão, pois não eliminam ovos viáveis nas fezes;

-O desenvolvimento ponderal de ovinos da raça Santa Inês até 75 dpi infectados com 2.000 cercárias de *S. mansoni* é negativo com recuperação compensatória;

-Há constatação de diminuição na contagem de hemácias dos ovinos da raça Santa Inês infectados com 2.000 cercárias dos 60 aos 105 dpi;

-Na infecção por *S. mansoni* em ovinos da raça Santa Inês, a fase aguda é caracterizada pelo aumento na contagem diferencial de neutrófilos segmentados e bastonetes e a fase crônica evidenciada pelo aumento na contagem de eosinófilos;

-A cinética de anticorpos IgG pelo método ELISA foi eficaz para detecção da infecção, assim como avaliação da resposta imune humoral, como marcadora de cronicidade na diluição 1:200, concomitante com a marcação de fase aguda pós-postural na utilização da diluição 1:400;

- A utilização do teste rápido para detecção de antígeno na urina foi capaz de identificar ovinos infectados por *Schistosoma mansoni*;

- A técnica da curetagem de mucosa retal é a mais indicada para o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* em ovinos da raça Santa Inês;

- A técnica de Girão e Ueno (1982) foi validada para detecção de ovos de *S. mansoni* em ruminantes;

-As lesões observadas nos cortes histopatológicos do fígado de ovinos da raça Santa Inês infectados experimentalmente por *S. mansoni*, são características da esquistossomose mansoni;

- Os parasitos recuperados pela técnica de perfusão das vísceras em ovinos da raça Santa Inês infectados são menores se comparados a outros ruminantes e humanos;

8. REFERÊNCIAS

- Adam SEI, Magzoub M 1976. Susceptibility of desert sheep to infection with *Schistosoma mansoni* of Northern Sudan. *Vet Pathol* 13: 211-215.
- Adam SEI, Magzoub M 1977. Clinico-Pathological changes associated with experimental *Schistosoma mansoni* infection in goat. *Br Vet Jour* 133:201-210.
- Almeida-Machado P 1982. The Brazilian Program for Schistosomiasis Control. *Amer J Trop Med Hyg* 31: 76-86.
- Amorim JP 1953. Infestação experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni* (Nota prévia). *Rev Bras Malariol* 5:219-222.
- Anderson H et al. 1991. Pathology of experimental *Schistosoma mansoni* infection in the Eastern woodchuck (*Marmota monax*). *Vet Pathol* 28:245-247.
- Antunes CMF et al. 1973. Role of *Nectomys squamipes* in the epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection. *Exp Parasitol* 34:181-188.
- Atta MA et al. 1981. Esquistossomose mansoni: Evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. *Rev Saud Publ* 15:72-92.
- Ayele B et al. 2008. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) strip for diagnosis of urinary schistosomiasis in Hassoba school children, Afar, Ethiopia. *Parasite* 15:69-75.
- Barbosa FS et al. 1958. Infestação natural e experimental de alguns mamíferos de Pernambuco por *Schistosoma mansoni*. *Rev Bras Malariol Doenç Trop* 10:137-144.
- Barbosa FS et al. 1962. *Schistosoma mansoni*: natural infection of cattle in Brazil. *Science* 138:831.
- Barbosa MA 1978. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev Inst Med Trop* 20: 121-132.
- Bastos OC et al. 1985. Variações nos níveis de células sanguíneas periféricas encontradas em *Holonichus brasiliensis nanus* Thomas 1987, infectados com *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, próprio da pré- Amazônia. *Rev Saúde Publ* 19:431-437.
- Bath GF et al. 1996. Skaap haarwurms: om te behandel of nie-dit is die vraag: Gebruik van die oogslymvlieskleur as leidraad. *Proceedings of the South African Veterinary Association Biennial National Veterinary Congress. Cape Town. Out.* 264-268.
- Bath GF et al. 2001. Using the Famacha system on commercial sheep farms in South Africa. In: *International Sheep Veterinary Congress. 1992, Cidade do Cabo África do Sul. Anais: University of Pretoria* 1:346pp.
- Bennema SC et al 2014. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. *Rev Inst Bras Med Trop* 56:35-41.

- Capron M, Capron A 1992. Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87:160-170.
- Carvalho OS et al. 2008. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose; uma visão multidisciplinar. *Livro*. Editora Fiocruz 124pp.
- Chaia G et al. 1968. Coprological diagnosis schistosomiasis II-Comparative study of comparative methods. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 10:349-353.
- Cheever AW 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull Wld Helth Org* 39:328-331.
- Chitsulo L et al. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 77:41-51.
- Chuah C et al. 2014. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitol* 30:141-150.
- Coelho, P.M.Z., Dias, M., Mayrink, W. Wild reservoirs of *Schistosoma mansoni* from Caratinga, an endemic area of Minas Gerais State. Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 163–164. 1979.
- Coelho MV. O parasito *Schistosoma mansoni* in Cunha AS 1970. *Livro* Esquistossomose mansoni. São Paulo: Editora Savier 1-12 435pp.
- Coelho PMZ et al. 1982. *Schistosoma mansoni*: experimental bovine Schistosomiasis. *Rev Inst Med Trop* 24:374-377.
- Colley DG et al. 1977. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. I: *In vitro* lymphocyte blastogenic responses to heterogeneous antigenic preparations from schistosome eggs, worms and cercariae. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 53: 420-433.
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica 2015. *Livro*. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 2º ed. Brasília. 329pp.
- Cunha AS 1970. Esquistossomose mansoni. *Livro*. Ed. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil. 435pp.
- Cunha EA 2008. Atualidades na produção de ovinos para corte. *Livro*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia. 152pp.
- D'Andrea PS et al. 2000. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water-rat *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitol* 120:573–582.
- D'Andrea, PS 2002. Experimental evidence and ecological perspectives for the adaptation of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Digenea: Shistosomatidae) to a wild host, the water-rat,

Nectomys squamipes Brants 1827 (Rodentia: Sigmodontinae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:11–14.

Desprès M 1980. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence of recent introduction of *Schistosoma mansoni* in to America. *Transac Roy Soc Trop Med Hyg* 74:826.

Doenhoff M J et al. 2004. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol* 20:35-39.

Erko E et al. 2013. Evaluation of urine-circulating cathodic antigen (Urine-CCA) cassette test for the detection of *Schistosoma mansoni* infection in areas of moderate prevalence in Ethiopia. *Trop Med Intern Healt* 18:1029–1035.

Falcão EC 2008. Pirajá da Silva: O incontestável descobridor do *Schistosoma mansoni*. *Livro*. 2 ed. Brasília. Brasil. Ministério da Saúde. 314pp.

Faust EC et al. 1934. Estudios sobre la esquistosomiasis mansoni em Puerto Rico. III. Estudio biológico: La etapa mamífera del ciclo vital. Puerto Rico. *Public Healt Trop Med* 10:197-254.

Faust EC et al. 1939. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminthes in fezes. *The J Parasitol* 26: 241-262.

Fenwick A 1969. Baboons as reservoir hosts of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 63:557–567.

Ferreira Neto et al. 1982. Patologia Clínica Veterinária. *Livro*. Belo Horizonte. Ed. Rabelo. 293pp.

Gazzinelli A et al. 1998. Domestic water use in a rural village em Minas Gerais, Brazil, with emphasis on spatial patterns, sharing of water and factors in water use. *Cad Saúde Públ* 14:265-277.

Gentile R et al. 2000. Population and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Stud Neotrop Fauna Environ* 35:1-9.

Girão ES, Ueno H 1982. Diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose de ruminantes do Rio Grande do Sul. *Pes Agrop Bras* 20:461-466.

-. Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais – Conceitos e Procedimentos Recomendados 2012. *Livro*. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Brasília. 1:62pp.

Gryseels B et al 2006. Humman schistosomiasis. *Lancet* 368:1106-1118.

Hams E et al. 2013. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol* 4:89.

Hockley DJ, McLaren DJ 1973. *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercariae to adult worm. *Internation J Parasitol* 3:13-25.

- Hyatt RA et al. 1979. Factors in the pathogenics of acute schistosomiasis mansoni. *The J Infect Dis* 139: 659-666.
- Jurberg AD et al. 2008. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 112-114.
- Karoum KO, Amin MA 1985. Domestic and wild animals naturally infected with *Schistosoma mansoni* in the Gezira irrigate scheme. Sudan. *Jour Trop Med Hyg* 88:83-90.
- Katz P et al. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 16: 397-400.
- Katz N, Peixoto SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33:303-308.
- Khammo N et al. 2002. The attachment of *Schistosoma mansoni* cercarie to human skin cells. *Parasitol* 124:25-30.
- Kloos H et al. 1998. Microgeographical patterns of schistosomiasis and water contact behavior; examples from Africa and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:37-50.
- Kuntz R E 1952. Natural infection of an Egyptian gerbil with *Schistosoma mansoni*. *Proc Helminth Soc Wash* 19:123-124.
- Lawrence JA 1980. The pathogenesis of *Schistosoma mattheei* in the sheep. *Res Vet Scienc* 29:1-7.
- Leal LM et al. 2006. Correlation between Eosinophils and Protection against Reinfection with *Schistosoma mansoni* and the Effect of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coinfection in Humans. *Infec Immunit* 74:2169-2176.
- Lenzi HL et al. 2008. Migração e desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi H. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. *Livro*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 85pp.
- Lopes JP 2009. Avaliação de métodos diagnóstico em bovinos infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni*. *Tese*. Grupo de Pesquisa Santa Casa de Belo Horizonte.
- Lowry OH et al. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Jour Biol Chem* 193:265-275.
- Luna LG 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *New York: McGraw-Hill Book Company* 258pp.
- Malherbe W 1970. A clinic-pathological study of bilharziasis in sheep. *Ond. Jour Vet Sci* 37:37-44.
- Martins AV 1937. Sobre a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* pelo método de sedimentação-concentração. *Braz Méd* 5: 319-21.

- Martins AV 1955. Reservatórios silvestres do *Schistosoma mansoni* no Estado de Minas Gerais. *Rev Bras Malariol Doenc Trop* 7:259–265.
- Martins IVF et al. 2014. Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update. *Rev Braz Jour Vet Parasitol* 23:23-29.
- Mayaudon HT, Power LA 1970. Infestacion natural de bovinos (*Bos taurus*) de Venezuela por *Schistosoma mansoni*. *Rev Med Parasitol* 23:1–8.
- McCully RM, Kuger SP 1969. Observations on Bilharziasis on domestic ruminants in South Africa. *Onderst Jour Vet Res* 36:129-162.
- Menezes H 1976. Schistosomiasis mansoni: lesions produced by dead worms in the liver and lungs. In F K Mostoffi Ed. Bilharziasis. *International Academy of Pathology Special Monographs*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 175-183.
- Miller P, Wilson RA 1978. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. *Parasitol* 77:281-302.
- Miller RL et al. 1992. Palaeoepidemiology of Schistosoma infection in mummies. *BMJ* 34:555-556.
- Modena CM 1989. Avaliação da infecção experimental e natural pelo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) em bovinos: uma abordagem epidemiológica. *Tese*. Univerdidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Modena CM et al. 1991. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansoni em bovinos. *Arch Bras Med Vet Zootec* 43:481–488.
- Modena CM et al. 1993. Transmission of *schistosoma mansoni* under experimental conditions using the bovine- *Biomphalaria glabrata*- bovine model. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 35:11-16.
- Modena CM et al. 1994. Variação hematológica em bovinos experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni*. *Arq Bras Med Vet Zoot* 46:362-368.
- Modena CM et al. 2008. Wild and domesticated animals as reservoirs of Schistosomiasis mansoni in Brazil. *Act Trop* 108:242-244.
- Moreau E, Chauvin A 2010. Immunity against Helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections. *Jour Biom Biot* 9pp.
- Nelson GS 1960. *Schistosoma* infections as zoonoses in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 54:301–316.
- Oliveira LM et al. 2010. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68: 416-421.

- Oliveira GC et al. 2004. Genome and genomics of Schistosomes. *Canad Jour Zool.* 82:375-390.
- Pearce EG, McLaren, DJ 1986. *Schistosoma mansoni*: the cutaneous response to cercarial challenge in naive guinea pigs and guinea pigs vaccinated with highly irradiated cercariae. *Internation Jour Parasitol* 16:491-510.
- Pellegrino J, Faria . 1965. The oograma method for the screening of drugs in *Schistosoma mansoni*. *The Am Jour Trop Med Hyg* 14:363-369.
- Pellegrino J, Coelho PMZ 1978. *Schistosoma mansoni*, wandering capacity of a worm couple. *Jour Parasitol* 64: 181.
- Pirajá da Silva MA 1908. Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia. Vinte observações. *Braz Med* 22:451-454.
- Pitchford RJ, Visser PS 1962. The role of naturally infected wild rodents in the epidemiology of schistosomiasis in the eastern Transvaal. *Trans R. Soc Trop Med Hyg* 56:126–135.
- Piva N, Barros PRC 1966. Infecção natural de animais silvestres e domésticos pelo *Schistosoma mansoni* em Sergipe. *Rev Bras Malarial Doenc Trop* 18:221–233.
- Prata A. Biopsia retal na esquistossomose mansoni. Bases e aplicações no diagnóstico e tratamento. Tese de concurso para catedrático de Clínica de Doenças Tropicais e Infecciosas da Faculdade de Medicina da Bahia. Rio de Janeiro. 1957 in Cunha AS 1970. Esquistossomose mansoni. *Livro*. Ed. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil. 435pp.
- Prata A, Coura JR 2008. Fases e formas clínicas da esquistossomose mansoni in Carvalho OS et al. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. *Livro*. Rio de Janeiro: Fiocruz 739pp.
- Preston JM et al. 1972. Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. 5. Heterologous schistosome immunity in sheep. *Bull Wld Hlth Org* 47:587-590.
- Rabello A, Pontes LA, Enk M, Montenegro SM, Morais CNL. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi H. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 895. 2008.
- Rey L. Parasitologia. *Livro*. Ed. Guanabara-Koogan. 4^a ed. Rio de Janeiro 2001.
- Saad, AM 1984. The pathogenesis of experimental *Schistosoma bovis* infections in Sudanese sheep and goats. *Jour Com Path* 94.
- Saeed AA, Nelson GS 1974. Experimental *Schistosoma mansoni* infection in sheep. *Trop Anim Hlth Prod* 6:45-52.
- Saiki RK et al. 1985. Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Scienc* 230:1350-1354.

- Sapero JJ, Lawless DK 1953. The MIF satin-preservation technic for identification of intestinal protozoa. *The Am J Trop Med Hyg* 2:613-619.
- Shane H.L et al. 2011. Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Western Kenya. *PLoS Negl Trop Dis* 5: 951.
- Silva RR et al. 1992. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni*: parasitological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87:271–276.
- Steinmann P et al. 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, metaanalysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 6: 411-426.
- Stirewalt MA, Dorsey CH 1974. *Schistosoma mansoni*: cercarial penetration of host epidermis at the ultrastructural level. *Exp Parasitol* 35: 1-15.
- Stothard, JR et al. 2006. Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis. *Act Trop* 97:219–228.
- Theron A et al. 2004. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitol* 129:571–585.
- Vadas MA 1980. Functional studies on purified eosinophils and neutrophils from patients with *Schistosoma mansoni* infections. *Clin Exp Immunol* 39:683-694.
- Van Dam GJ et al. 2004. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *Jour Clin Microbiol* 42:5458-5461.
- Van Der Werf MJ 2003. No effect of recall period length on prevalence of self-reported haematuria in *Schistosoma haematobium*-endemic areas. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97:373-374.
- Van Weemen BK, Schuurs AHM 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *Febs Letters* 15:232-236.
- Van Wyk JA 1997. *Schistosoma mattheei* infection in cattle: The course of the intestinal syndrome, and an estimate of the lethal dose of cercariae. *Ond Jour Vet Res Vol* 64:65-75.
- Valadares E et al. 1981. *Schistosoma mansoni*: Comparação da oviposição entre as cepas LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) e ST (Libéria), em camundongos. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 23: 1-5.
- World Health Organization. *Schistosomiasis and control*. 2004.
- World Health Organization. Scientific Group on Research in Bilharziasis (Chemotherapy), Geneva, 1964. *Chemotherapy of Bilharzias; report*. Geneva, 1966. (Techn. Rep. Ser., 317).
- Zanotti EM et al. 1982. Morphology and development of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 in unisexual infections produced experimentally in mice. *Rev Saúd Públ* 16:2.

Anexo 1: Ficha de avaliação clínica para ovinos.

Exame clínico dos ovinos	
Animal:	Data:
Peso:	
Mucosa (Famacha): 1 ótima () 2 Boa () 3 Regular () 4 Ruim () 5 Risco de morte ()	
Condição corporal: 1 () 1,5 () 2 () 2,5 () 3 () 3,5 () 4 () 4,5 () 5 ()	
Pelagem: () Normal () Opaca () Quebradiço () Alopecia	
Brilho ()+ ()++ ()+++	
Alimentação () Normal () Diminuída () Inapetência () Aumentada	
Contorno abdominal: Normal () Ascite () Assimetria () - Lado D () E ()	
Palpação abdominal	
Pressão: Tensão normal () Tensão aumentada () Tensão diminuída ()	
Sensibilidade dolorosa: Presente () Ausente ()	
Fígado: Palpável () Não palpável ()	
Observações:	
Movimentos ruminais (Nº/ 5 min.):	
Respiratório	
Secreção nasal () Presente () Ausente	
() Unilateral D E () Bilateral	
() Serosa () Mucosa () Mucopurulenta () Purulenta () Fibrinonecrotica	
Percussão	
Seios nasais () Normal () Congesto	
Seios paranasais () Normal () Congesto	
Sensibilidade dolorosa () Presente () Ausente	
F.R. (nº mov./ min.) N°:.....	
Auscultação: () Normal () Estertores aumentados	
Tosse: () Presente () Ausente	
Observações:	
Cardíaco F. C. (nº BPM): N°	
Pulso da veia jugular () Presente () Ausente	
Fezes	
Aspecto () Normal () Amorfa () Diarreica	

Muco () + () ++ () +++
Temperatura retal:
Observações: