

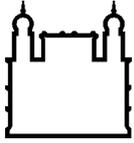
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**Estudos morfológicos e morfométricos de espécimes de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas**

**JÉSSICA DE ASSIS SANTOS**

Rio de Janeiro  
Junho de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

**JÉSSICA DE ASSIS SANTOS**

Estudos morfológicos e morfométricos de espécimes de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela Rodrigues e Silva

**RIO DE JANEIRO**

Junho de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S237 Santos, Jéssica de Assis

Estudos morfológicos e morfométricos de espécimes de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas / Jessica de Assis Santos. – Rio de Janeiro, 2014.

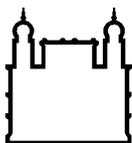
xvi, 70 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2014.

Bibliografia: f. 59-70

1. Morfologia. 2. Morfometria. 3. *Fasciola hepatica*. I. Título.

CDD 616.362



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

**JÉSSICA DE ASSIS SANTOS**

**Estudos morfológicos e morfométricos de espécimes de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)  
provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela Rodrigues e Silva**

**Aprovada em: 30/ 06/ 2014**

**EXAMINADORES:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Cohen (IOC - Fiocruz)**

**Prof. Dr. Débora Henrique da Silva Anjos (UFRJ)**

**Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva (UFRRJ)**

**Prof. Dr. Renata Heisler Neves (UERJ)**

**Prof. Dr. Luiz Muniz-Pereira (IOC - Fiocruz)**

**À Guaranice Maria, minha avó, exemplo eterno, por sempre me ensinar o valor da dedicação e do aprendizado.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, soberano, por me dar a oportunidade de viver cada dia.

Aos amigos do Laboratório de Helminhos Parasitos de Vertebrados, especialmente ao Serviço de Referência Nacional em Hidatidose (SRNH), por serem meus companheiros diários nesta empreitada. Pelo apoio sempre constante, pela convivência excepcional e, principalmente, pelas amizades que serão estendidas por toda a minha existência. Obrigada, pessoal!

À minha orientadora Rosângela Rodrigues e Silva, pela oportunidade de fazer parte do grupo do SRNH, por acreditar em mim, pelo apoio e por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

À Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde por me conceder a oportunidade de conviver com professores extraordinários, com os quais muito aprendi. Obrigada, também, pela chance de conhecer amigos tão maravilhosos com quem pude dividir minhas dúvidas, tristezas e medos: Carla, Carlos, Tayra e Thiago. Obrigada!

À CAPES pelo financiamento desta pesquisa, que possibilitou a execução deste trabalho.

Aos doutores Adriana Mello Garcia (Universidade Federal de Lavras), Silvana Carnevale (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – Argentina), Jorge Velásquez (Hospital Municipal de Infecciosas – Argentina) e Jorge Bruno Malandrini (Universidade Nacional de Catamarca), por cederem o material utilizado neste estudo.

Ao Laboratório Romero Lascasas Porto, especialmente aos doutores José Roberto Machado-Silva, Renata Heisler Neves e José Eduardo Torres pelo apoio, estando sempre presentes e disponíveis nos momentos de incerteza.

À minha mãe, meu porto seguro, por ser meu anjo protetor na Terra. Por ter abdicado de tudo para me amparar, por ser meu apoio nos momentos difíceis e por ser a maior torcedora pelo meu sucesso!

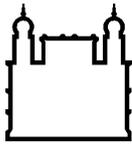
Ao meu marido, meu companheiro. Obrigada por me acalantar nas horas de dificuldade e estresse, sempre me incitando a seguir em frente. Amo você!

À minha família e amigos, por serem a parte mais leve da minha vida. Com vocês, tudo fica mais fácil.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Não esmorecer para não desmerecer”**

***Oswaldo Cruz***



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Morfologia e morfometria de espécimes de *Fasciola hepatica* provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas**

### **RESUMO**

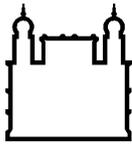
#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE**

**Jéssica de Assis Santos**

A fasciolíase tem sido considerada uma infecção de grande importância para a saúde pública, além de causar impactos na economia, devido ao aumento do número de casos. É considerada endêmica no Peru e na Bolívia. No Brasil, a doença é endêmica no estado do Rio Grande do Sul. Apesar de estudos morfológicos e morfométricos terem sido realizados ao longo dos últimos dez anos, ainda são poucas as informações relacionadas à morfologia de *Fasciola hepatica*. Estudos realizados com espécimes de diferentes regiões geográficas demonstram que as características morfométricas de vermes adultos e ovos podem variar de acordo com a localidade de origem do hospedeiro.

Neste estudo avaliamos se estas variações também ocorrem em espécimes obtidos de bovinos provenientes de quatro diferentes áreas geográficas, utilizando diferentes técnicas de microscopia. Para isso, os vermes adultos foram submetidos à microscopia de campo claro, microscopia de campo claro com interferência diferencial, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser. Os resultados obtidos através dos estudos morfológicos, para cada localidade, demonstram diferenças entre os espécimes estudados, principalmente quando o tegumento foi observado.

Para a morfometria, foram analisadas estruturas (comprimento total e largura total do corpo, proporção do comprimento/largura totais, comprimento e largura do cone cefálico, ventosa oral e ventosa ventral, distância entre ventosas) de espécimes adultos provenientes de Cordeiro (RJ), Lavras (MG), Catamarca e Salta (Argentina). Quando analisados o comprimento do corpo, largura do corpo, comprimento do cone, largura do cone, distância entre ventosa oral e ventosa ventral, as medidas apresentaram diferenças entre as localidades e os resultados obtidos por outros autores. Os espécimes do município de Lavras apresentaram as maiores medidas, diferente dos espécimes da província de Salta, que apresentaram as menores medidas, quando comparados com as outras localidades. Foi também medido o comprimento, a largura e a área de 77 ovos. Os resultados diferiram daqueles descritos na literatura, possivelmente pelo fato do presente trabalho ter realizado as análises em ovos uterinos, diferente dos demais autores, que analisaram os ovos nas fezes.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Morphology and morphometry of *Fasciola hepatica* specimens from cattle in different geographical areas**

#### **ABSTRACT**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE**

**Jéssica de AssisSantos**

The fascioliasis infection has been considered of great importance to public health and cause economic impacts due to the increased number of cases in recent years. It is considered endemic in Peru and Bolivia. In Brazil, the disease is endemic in the state of Rio Grande do Sul. Although morphological and morphometric studies have been conducted over the past few years, little is known about the morphology of *Fasciola hepatica*. Studies conducted with specimens from different regions show that the morphometric characteristics of adult worms and eggs can vary according to location of host origin.

We evaluated whether these changes also occur in specimens obtained from cattle from four different geographical areas using different microscopy techniques. For this, the adult worms were subjected to bright field microscopy, brightfield microscopy with differential interference contrast, scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. The results obtained from morphological studies, in each locality, demonstrate differences between the studied specimens, especially when the tegument was observed.

For morphometry, structures (total length and width oral total body length ratio / total width, length and width of the cone head, sucker and ventral sucker, distance between suckers) of adult specimens from Lamb (RJ) were analyzed, mines (MG), Catamarca and Salta (Argentina). When analyzed body length, body width, length of the cone, cone width, distance between oral sucker and ventral sucker measures showed differences between localities and the results obtained by other authors. Specimens of Lavras had the highest measures of different specimens from the province of Salta, which had the lowest measures when compared to other locations. Also measured was the length, width and area of 77 eggs. The results differ from those described in the literature, possibly because of this work have performed the analyzes in uterine eggs, unlike other authors, who analyzed the eggs in the feces.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>XVI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Taxonomia_____	3
1.2 Histórico_____	4
1.3 Morfologia_____	6
1.4 Ciclo biológico_____	9
1.5 Relação parasito-hospedeiro_____	11
1.6 Patologia da Fasciolíase animal_____	12
1.7 Diagnóstico_____	14
1.8 Tratamento_____	15
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
3.1 Objetivo Geral_____	17
3.2 Objetivos Específicos_____	17
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
4.1 Áreas de estudo_____	18
4.2 Preparo das amostras_____	18
4.3 Análise morfométrica e morfológica_____	19
4.4 Análise estatística_____	21
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>22</b>
5.1 Morfologia_____	22
5.2 Morfometria_____	41
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Espécime adulto de <i>Fasciola hepatica</i> . Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose	6
Figura 2: Ovos de <i>Fasciola hepatica</i> . Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose	7
Figura 3: Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> . Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose	10
Figura 4: Espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> em fígado de bovino em abatedouro do município de Cordeiro/RJ - Brasil. Fonte: Serviço de Referência nacional em Hidatidose	13
Figura 5: Mapa da América do Sul evidenciando as áreas de procedência do material estudado (Ilustração: Heloisa Diniz- Serviço de Produção e Tratamento de Imagem- IOC – Fiocruz)	19
Figura 6: Espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> corados com carmim alcoólico de Langeron. Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose	21
Figura 7: Desenho esquemático dos caracteres utilizados na morfometria de espécimes adultos de <i>Fasciola hepatica</i> , de acordo com Valero et al., 2005	22
Figura 8: Desenho esquemático dos caracteres utilizados na morfometria de ovos de <i>Fasciola hepatica</i> , de acordo com Valero et al., 2005	22
Figura 9: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos do município de Cordeiro/ RJ - Brasil, visualizadas na microscopia de campo claro	25
Figura 10: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Catamarca – Argentina, visualizadas na microscopia de campo claro	26
Figura 11: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Salta – Argentina, visualizadas na microscopia de campo claro	27
Figura 12: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> de bovinos do município de Lavras/ MG - Brasil, visualizadas na microscopia de campo claro	28
Figura 13: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Cordeiro/ RJ - Brasil, visualizadas na microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial	29

Figura 14: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Salta – RJ, visualizadas na microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial	30
Figura 15: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Catamarca - Argentina, visualizadas na microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial	30
Figura 16: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos do município de Lavras – MG, visualizadas na microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial	31
Figura 17: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Catamarca – Argentina, visualizadas na microscopia eletrônica de varredura	33
Figura 18: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos do município de Cordeiro – RJ, visualizadas na microscopia eletrônica de varredura	34
Figuras 19: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos do município de Cordeiro – RJ, visualizadas na microscopia eletrônica de varredura	35
Figura 20: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos do município de Lavras – MG, visualizadas na microscopia eletrônica de varredura	36
Figura 21: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos do município de Cordeiro – RJ, visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser	38
Figura 22: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Catamarca – Argentina, visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser	39
Figura 23: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Catamarca – Argentina, visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser	40
Figura 24: Estruturas morfológicas de <i>Fasciola hepatica</i> proveniente de bovinos da província de Salta – Argentina, visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser	41

Figura 25: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Lavras – MG, visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser \_\_\_\_\_ 42

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Análise morfométrica do comprimento total (CT) de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	45
Gráfico 2: Análise morfométrica da largura total (LT) de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	46
Gráfico 3: Análise morfométrica da razão comprimento total (CT)/ largura total (LT) de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	46
Gráfico 4: Análise morfométrica do comprimento do cone cefálico (CC) de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	47
Gráfico 5: Análise morfométrica da largura do cone cefálico (LC) de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	48
Gráfico 6: Análise morfométrica da área da ventosa oral (VO) de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	48
Gráfico 7: Análise morfométrica da área da ventosa ventral (VV) de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	49
Gráfico 8: Análise morfométrica da distância entre as ventosas (VO - VV) de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	50
Gráfico 9: Análise morfométrica do comprimento dos ovos (CO) presentes no útero de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	51
Gráfico 10: Análise morfométrica da largura dos ovos (LO) presentes no útero de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	51
Gráfico 11: Análise morfométrica da área dos ovos (AO) presentes no útero de espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> procedentes de bovinos, por meio de análise digital_____	52

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**C** - Cirro

**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CC** - Comprimento do Cone

**CENABIO** - Centro Nacional de Bioimagem

**CO**– Comprimento do Ovo

**CT** – Comprimento Total

**E** – Espinhos

**F** – Faringe

**G** –Gonoporo

**I** – Ramos Intestinais

**LC** – Largura do Cone

**LO** – Largura do Ovo

**LT** – Largura Total

**UFRJ** – Universidade Federal do Rio de Janeiro

**VO** – Ventosa Oral

**VO – VV** – Distância entre Ventosa Oral e Ventosa Ventral

**VV** – Ventosa Ventral

**DIC** – Microscopia de Campo Claro com Contraste de Interferência Diferencial

# 1. INTRODUÇÃO

O platelminto *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) é encontrado no fígado e nas vias biliares de diversas espécies de animais domésticos e silvestres, e também do homem. É responsável por uma doença que acomete frequentemente bovinos e ovinos, mas também pode ser diagnosticada em caprinos, eqüinos, bubalinos (Pile et al., 2001), suínos (Araújo et al., 1995), animais silvestres e no homem (Apt et al., 1993). A doença conhecida como fasciolíase apresenta distribuição mundial e possui grande importância econômica na medicina veterinária, devido à condenação de fígados e carcaças e perda da qualidade do leite (Queiroz et al., 2002).

Apesar de ser uma zoonose de ampla distribuição geográfica, o maior número de casos relatados se encontra na América Latina, sendo endêmica na Bolívia e no Peru. Porém, a doença não é exclusiva de países subdesenvolvidos, visto que ocorre nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo considerada um problema mundial (Gulsen et al., 2006). Na Europa existem casos relatados na França, Portugal, Espanha e Reino Unido (Esteban et al., 1998). Os relatos da doença na Ásia, na África e na Oceania têm crescido ao longo dos anos (Kimura et al., 1984; Şakru et al., 2011).

No Brasil, há casos confirmados em animais e humanos nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Gomes et al., 2002). O Estado do Rio Grande do Sul é considerado endêmico para a doença (Cunha et al., 2007).

*F. hepatica* possui um ciclo de vida heteroxênico. Os hospedeiros intermediários são moluscos do gênero *Lymnaea* e os hospedeiros definitivos são principalmente ovinos, bovinos e o homem (Cunha et al., 2007; Oliveira et al., 2007). Existem, também, casos de *F. hepatica* encontrados em roedores, equinos, caprinos, suínos, coelhos e lebres, estes atuando como reservatórios (Silva Santos et al., 1992; Espinoza et al., 2010).

Estudos demonstram que as características morfométricas de vermes adultos e ovos de *F. hepatica* variam de acordo com a espécie do hospedeiro definitivo (Valero et al., 2001; Mas-Coma, 2004). Alguns autores têm diferenciado as espécies do gênero *Fasciola* com base nos padrões de ramificação dos órgãos reprodutores e do intestino (Periago et al., 2006). O estudo do tegumento também é importante, pois ele é a interface entre o parasito e o meio ambiente e é uma das principais rotas para a entrada de compostos no parasito, além de desempenhar uma função de proteção contra o ataque do sistema imunológico e a ação dos anti-helmínticos (McConville et al., 2008).

A morfologia tem sido o critério mais usado para estudos sistemáticos sobre o gênero *Fasciola*. A microscopia de campo claro é uma técnica muito eficiente de

comparação entre as espécies de *Fasciola* e subespécies de *F. hepatica* (Valero et al., 2005; Periago et al., 2006). A microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica estão sendo utilizadas em estudos morfológicos acerca da fisiologia de helmintos, complementando a microscopia de campo claro (Mair et al., 1998a; Toner et al., 2008).

## 1.1. TAXONOMIA

*Fasciola hepatica* é um parasito que pertence ao Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda, Subclasse Digenea, Família Fasciolidae, Gênero *Fasciola* (Marques, 2002). Atualmente são reconhecidas duas espécies que infectam animais e humanos: *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*. *Fasciola hepatica* tem uma ampla distribuição, principalmente em zonas temperadas, enquanto que *Fasciola gigantica* é encontrada em regiões tropicais da África e da Ásia (Valero et al., 2009). Porém, ocorre sobreposição geográfica das duas espécies em alguns países da África e Ásia (Periago et al., 2008).

A diferenciação entre as duas espécies do gênero *Fasciola* pode ser feita com base na morfologia dos vermes adultos (Periago et al., 2006) e por meio de técnicas de biologia molecular (Marcilla et al., 2002). O DNA ribossomal é um dos marcadores mais utilizados em estudos genéticos, pois é disponível em alto número de cópias e contém regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas (Chilton, 2004). Outros marcadores moleculares frequentemente usados são as sequências de DNA mitocondrial. Praticamente todos os organismos eucariotas contêm um genoma mitocondrial que evolui mais rapidamente do que o genoma nuclear, sendo apropriado para discriminar organismos estreitamente relacionados, especialmente nos níveis espécie e subespécie (Galtier et al., 2009; Li et al., 2008).

Espécimes oriundos de animais japoneses apresentaram sequências de DNA ribossomal idênticas aos de *F. hepatica* e sequências de DNA mitocondrial idênticas ao de *F. gigantica*, o que comprovou a existência de formas híbridas. Tal fenômeno tem sido descrito apenas em áreas endêmicas da Ásia. No entanto, formas intermediárias têm sido descritas nas províncias de Gilan, Irã, onde a doença é considerada um sério problema de saúde humana e animal (Periago et al., 2008).

Durante as últimas duas décadas, diferentes métodos sorológicos têm sido usados para o diagnóstico do parasito tanto nos moluscos, quanto nos hospedeiros definitivos. Os testes sorológicos para detecção de anticorpos é o método escolhido para o imunodiagnóstico de fasciolíase. As principais vantagens são a facilidade na obtenção de reagentes e o fato de que as infecções podem ser detectadas precocemente. A principal desvantagem da técnica é a ausência de antígenos específicos disponíveis no mercado (Esteban et al., 1998).

## 1.2. HISTÓRICO

O primeiro trabalho relacionando lesões no fígado de animais a *Fasciola hepatica* foi realizado em 1739 por Jehan de Brie (Gomes et al., 2002) em ovinos, primeiramente sendo conhecida como uma enfermidade de animais domésticos na Europa (Grove et al., 1990). Sua primeira descrição em bovinos aconteceu em meados do século XVII por Francisco Redi. Foi o primeiro trematódeo a ter o ciclo biológico descrito, através dos estudos de Leuckart e Thomas, que também citou *Lymnaea truncatula* como hospedeiro intermediário (Hatschbach, 1995). Mais recentemente, a fasciolíase foi adicionada à lista das helmintoses de grande impacto no desenvolvimento humano (Mas-Coma et al., 2005).

Bidloo encontrou parasitos dentro dos dutos biliares de ovelhas, veados e vitelos e observou ovos dentro dos parasitos. Otto Müller observou formas com cauda nadando em poças de água e as denominou cercárias. Mehlis observou a saída do miracídio através do opérculo dos ovos dos trematódeos, o que foi verificado para *F. hepatica* anos depois por Creplin (Costa, 2010).

Serra-Freire, em 1999, descreve que a primeira citação da ocorrência de *F. hepatica* nas Américas foi realizada no Uruguai, por Walffugel, tendo *Hydrochoerus hydrochaeris* (capivara) como hospedeiro vertebrado.

Na Argentina, a doença já era conhecida por ocorrer em bovinos, caprinos e no homem. Porém, não se conhecia a existência de um hospedeiro intermediário do parasito e acreditava-se que a infecção ocorria pela ingestão da água com o verme. O primeiro relato desta doença em bovinos se deu no século XIX (Durand Savoyat et al., 1867). Vários estudos epidemiológicos foram publicados neste país ao longo dos anos (Roffo, 1913; Greenway, 1924; Bengolea et al., 1927; Bacigalupo et al., 1930; Mera y Sierra, 2011). Dwinger et al., em 1982 publicaram um relato de caso de fasciolíase acometendo bovinos em algumas províncias do país. Os autores utilizaram técnicas coprológicas para procura dos ovos do helminto em animais de abatedouros e analisou a prevalência e gravidade da doença na localidade. A partir dos dados, os autores concluíram que a infecção é bem disseminada na região, mas em níveis baixos.

No Brasil, o primeiro relato de *Fasciola hepatica* foi feito por Lutz em 1921, após um achado eventual em fígado de bovinos no Estado do Rio de Janeiro. A partir deste trabalho foram feitas várias observações pelo país, em sua maioria relatando a ocorrência desta parasitose em animais de abatedouros (Ribeiro, 1949; Corrêa, 1965; França, 1969; Alves, 2010). Dados estatísticos fornecidos pelo Serviço de Inspeção

Federal do Ministério da Agricultura no Brasil mostram que a ocorrência de *F. hepatica* e a condenação de fígados de bovinos abatidos vêm aumentando gradativamente (Alves, 2010).

Ueno et al., em 1982 observaram a atuação de *Lymnaea viatrix* e *Lymnaea columella* como hospedeiros intermediários de *F. hepatica* e a presença de tais espécies no Rio Grande do Sul. Os autores revelaram que *L. viatrix* é mais predominante do que *L. columella* em regiões com altas taxas de contaminação por *Fasciola hepatica*. Os autores também registraram a condenação de um alto número de fígados, revelando o encontro de várias áreas endêmicas próximas à fronteira do sul do estado. No mesmo estudo, *L. viatrix* foi caracterizado como um molusco encontrado em regiões alagadiças e de água parada e em canais de irrigação. Já *L. columella* é conhecido por habitar superfície inferior de plantas aquáticas.

Bennema et al., 2014 em estudo realizado sobre a distribuição de fasciolíase no Brasil relatou as espécies *Pseudosuccinea columella*, *Galba viatrix*, *Galba cubensis* e *Galba truncatula* como susceptíveis à infecção por *F. hepatica* no Brasil. Os autores destacam, ainda, a importância de trabalhos acerca da distribuição da doença para a criação de métodos de prevenção da doença.

### 1.3. MORFOLOGIA

O parasito adulto mede cerca de 2 centímetros de comprimento por 1,5 centímetro de largura. Possui o corpo achatado dorso-ventralmente e duas ventosas musculares, uma oral e outra ventral (Baruch, 1999). As ventosas auxiliam na adesão do parasito aos tecidos do hospedeiro. O poro genital se localiza entre as duas ventosas e é uma abertura comum ao sistema genital masculino e feminino. O tegumento é coberto por espinhos que auxiliam na fixação do parasito nos dutos biliares. Grupos de papilas sensoriais encontram-se na superfície corporal do parasito, sendo mais numerosas na região anterior do corpo, em torno e ao lado das ventosas. O sistema nervoso central de *F. hepatica* envolve um par de gânglios, que surgem a partir da faringe, logo abaixo da ventosa oral. O sistema digestório é formado pela faringe, esôfago e cecos intestinais, que terminam em fundo cego. O sistema excretor é composto por células-flama que lançam os produtos de excreção para fora do corpo através de um poro situado na porção final do corpo (Paula, 2007). É hermafrodita, e os órgãos sexuais encontram-se na zona central (Rey, 2002) (Figura 1).

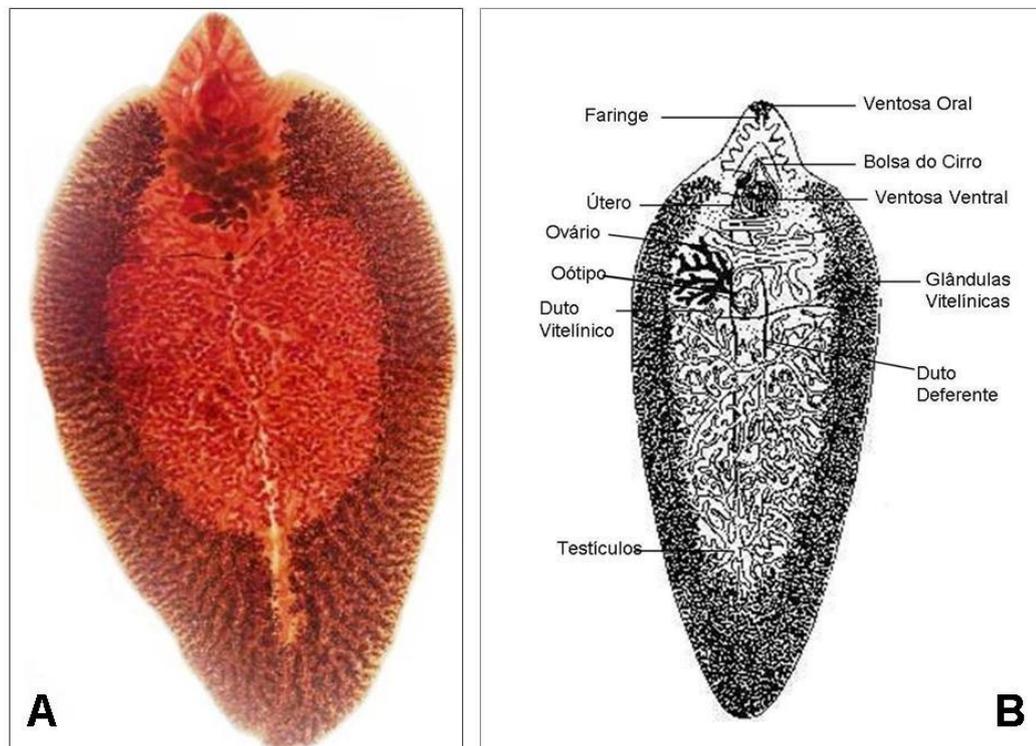


Figura 1: (A) Espécime adulto de *Fasciola hepatica*. Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose/LHPV/IOC-Fiocruz). (B) Esquema da morfologia de *Fasciola hepatica*. Adaptado de Dawes, B (1946)

Os ovos do parasito são constituídos por um óvulo fertilizado, contendo células vitelínicas, rodeado por um invólucro protéico (Hussein et al., 2010). Medem cerca de 150  $\mu\text{m}$  de comprimento e 100  $\mu\text{m}$  de largura, possuem forma elíptica, cor amarelada e em uma de suas extremidades apresenta uma abertura que é fechada pelo opérculo, por onde saem os miracídios (Baruch, 1999). Os ovos são muito resistentes, sobrevivendo por muitos meses no solo (Rey, 2002) (Figura 2).

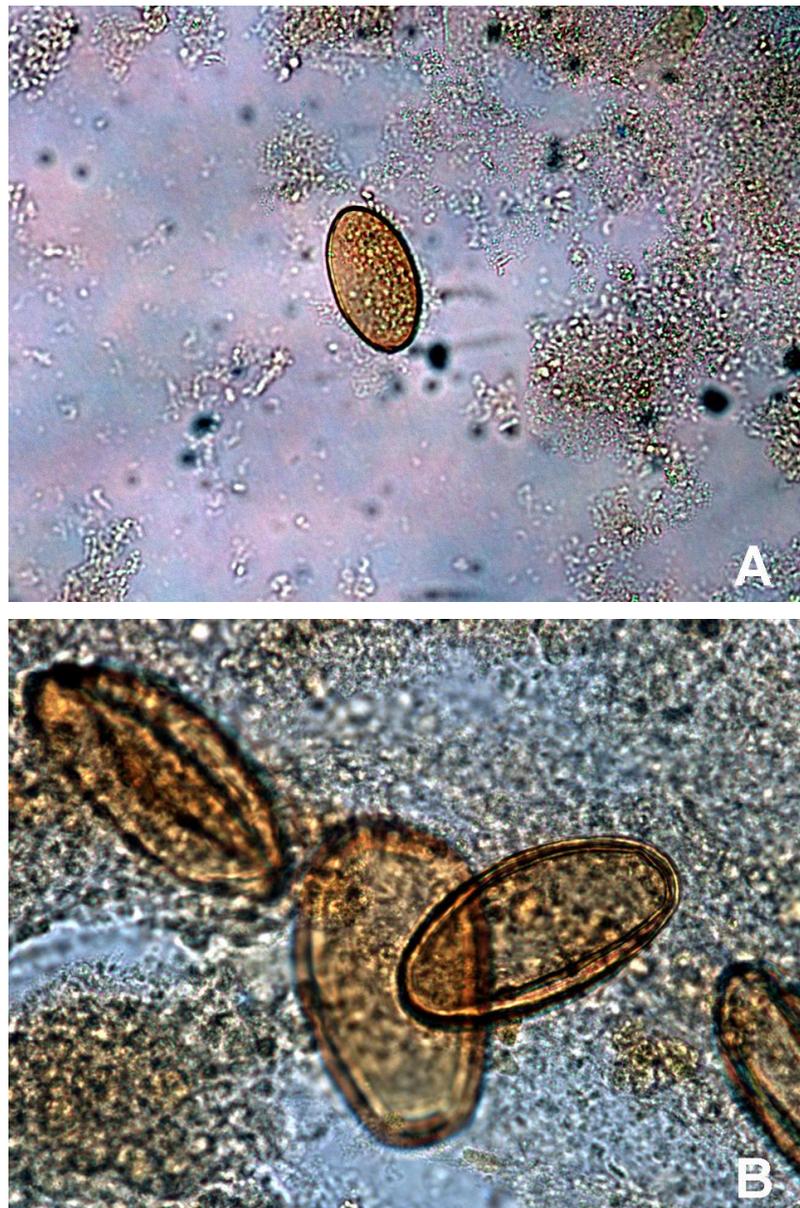


Figura 2: Ovos de *Fasciola hepatica*. Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose/LHPV/IOC-Fiocruz).

Os miracídios, primeiro estágio larvar do parasito, medem aproximadamente o mesmo comprimento dos ovos, tem placa epidérmica ciliada e são mais largos na porção anterior e afilados na posterior (Oliveira, 2008). Vivem por um curto período na água, entre a eclosão do ovo e a penetração no molusco (Rey, 2002). Os esporocistos possuem forma de saco alongado, apresentando em seu interior aglomerados de células germinativas em multiplicação (Oliveira, 2008).

As rédias possuem forma cilíndrica e medem de 1–3 mm de comprimento (Oliveira, 2008). Apresentam um esboço do aparelho digestório. Na região anterior do corpo, possui uma abertura por onde sairão as cercárias que são formadas a partir de células germinativas em contínua multiplicação no interior das rédias (Rey, 2002).

As cercárias têm aspecto de disco, medem de 250-350 µm de comprimento com uma cauda longa e não bifurcada (Oliveira, 2008). Assim como a forma adulta de *Fasciola hepatica*, possui ventosas oral e ventral, faringe, esôfago e intestino. Lateralmente existem glândulas cistogênicas, envolvidas no processo de encistamento (Rey, 2002).

A metacercária é a forma evolutiva da cercária, encistada, e tem tonalidade amarelada (Andrews, 1999; Oliveira, 2008). Com a perda da cauda, formou uma membrana de proteção em torno de si (Rey, 2002).

## 1.4. CICLO BIOLÓGICO

*Fasciola hepatica* possui um ciclo de vida heteroxênico (Figura 3), isto é, necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo (Mas-Coma et al., 2005). A possibilidade de infecção ocorre quando estão presentes, no mesmo ambiente, moluscos do gênero *Lymnaea*, hospedeiro intermediário (Oliveira et al., 2005), e ovinos e bovinos, hospedeiros definitivos infectados (Cunha et al., 2007; Oliveira et al., 2007). Existem, também, casos de *F. hepatica* encontrados em roedores, equinos, caprinos, suínos, coelhos e lebres (Silva Santos et al., 1992; Espinoza et al., 2010), estes atuando como reservatórios.

O ciclo se inicia quando os ovos são eliminados nas fezes de animais infectados e ao chegarem na água, os miracídios eclodem, infectam o hospedeiro intermediário e se desenvolverão até a fase de cercárias. Se as condições climáticas forem favoráveis, as cercárias abandonam o molusco, migram para a superfície de plantas aquáticas e se transformam em cistos denominados metacercárias (Alatoon et al., 2008).

O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir a água ou alimentos contaminados pelas metacercárias. No duodeno, as larvas se libertam do envoltório, atravessam a parede intestinal, migram pelo parênquima hepático, chegando aos ductos biliares, onde atingem a maturidade. O processo de maturação dura aproximadamente dois meses, porém nem todas alcançam a maturidade ao mesmo tempo. O ciclo reinicia com a oviposição (Marques, 2002).

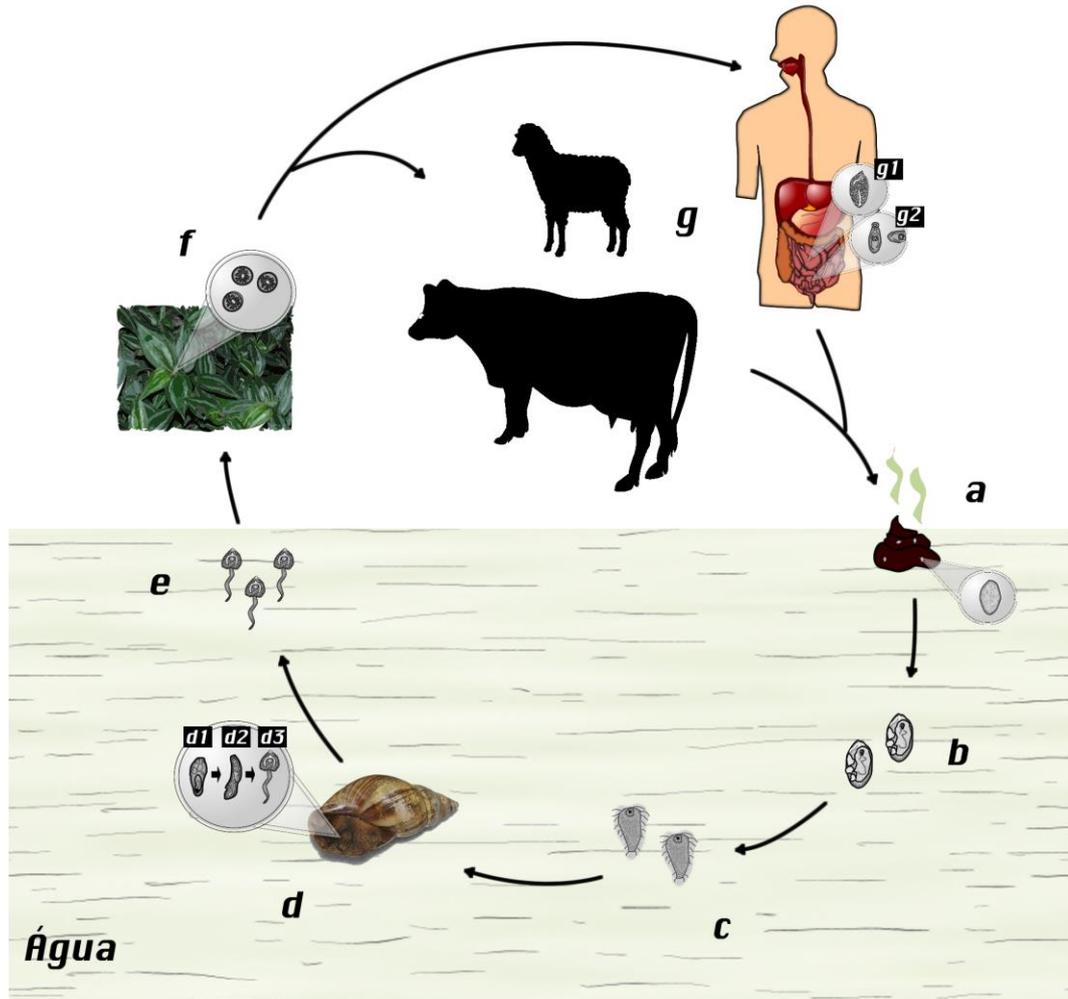


Figura 3: Ciclo biológico de *Fasciola hepática*. (a) Fezes infectadas com ovos de *Fasciola hepática*; (b) Ovos embrionados na água; (c) Miracídios penetrando molusco; (d) Molusco infectado: **D1**, Esporocisto; **D2**, Rédia; **D3**, Cercária; (e) Cercárias de vida livre; (f) Metacercárias em planta aquática; (g) Hospedeiros definitivos: **G1**, Forma juvenil no duodeno **G2**, Verme adulto nas vias biliares. Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose/LHPV/IOC-Fiocruz.

## 1.5. RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

### 1.5.1. Hospedeiro intermediário

Os moluscos limneídeos medem aproximadamente 10 mm de comprimento e 6 mm de largura, são hermafroditas e possuem ampla distribuição nas áreas tropicais da América, Ásia, Europa, África e Oceania. Possuem grande importância, pois atuam como hospedeiros intermediários de várias espécies parasitas (Medeiros et al., 2014). É relatado que indivíduos desta família podem albergar estágios larvais de mais de 70 diferentes trematódeos (Dreyfuss et al., 2014).

Uma extensa gama de moluscos limneídeos pode ser infectada por *Fasciola hepatica*. No entanto, *Galba truncatula* é considerado o hospedeiro intermediário mais eficiente na transmissão (Bargues et al., 2012). O parasito provoca vários efeitos negativos no hospedeiro intermediário, incluindo diminuição de fecundidade, aumento de mortalidade, destruição da glândula digestiva, mudanças metabólicas e aumento da sensibilidade ambiental (Graczyk & Fried, 1999). Essas alterações podem ocasionar uma grande pressão seletiva nas populações de moluscos (Hurtrez-Boussès et al., 2001).

Infecções experimentais têm mostrado que o parasito induz maior mortalidade nos moluscos provenientes de populações de baixa prevalência do que naqueles provenientes de populações de alta prevalência. Isso indica a possibilidade de uma co-adaptação entre o hospedeiro e o parasito (Hurtrez-Boussès et al., 2001).

### 1.5.2. Hospedeiro definitivo

*Fasciola hepatica* possui um amplo espectro de hospedeiros definitivos: humanos, animais de criação e selvagens. Os níveis de infecção variam entre locais e espécies (Hurtrez-Boussès et al., 2001).

Entre as espécies de hospedeiros definitivos existe uma variação na susceptibilidade à infecção e na resposta imune contra o parasito. De acordo com estudos experimentais, bovinos têm desenvolvido resistência imunológica contra *F. hepatica*, enquanto caprinos têm pouca ou nenhuma resistência (Sinclair, 1962; Sandeman & Howell, 1981). Alguns trabalhos sugerem que a variação na imunidade do hospedeiro pode resultar em pressões seletivas que levam à especiação (Panaccio & Trudgett,

1999; Hurtrez-Boussès et al., 2001). A morfologia de vermes adultos e ovos varia entre os diferentes hospedeiros definitivos (Stunkard, 1957; Abrous et al., 1998).

Estudos realizando infecção experimental de moluscos demonstraram que miracídios do parasito obtidos de diferentes espécies de hospedeiros definitivos diferem significativamente em sua morfologia. Um maior conhecimento da relação entre *F. hepatica* e seus hospedeiros é fundamental para a elaboração de programas de controle eficazes (Rondelaud & Dreyfuss, 1995; Hurtrez-Boussès et al., 2001).

## 1.6. PATOGÊNESE DA FASCIOLÍASE ANIMAL

A patogenia e sintomatologia provocadas por *Fasciola hepatica* variam de acordo com a carga parasitária, fase de desenvolvimento do parasito, tipo e idade do hospedeiro (Mendes, 2006).

A fasciolíase pode ser classificada como aguda, subaguda ou crônica. A forma aguda da doença raramente é observada em bovinos (Radostists et al., 2000), acometendo principalmente ovinos (Urquhart et al., 1996).

Na fase aguda o fígado pode se apresentar dilatado. Ao corte, o parênquima hepático apresenta focos hemorrágicos difusos e presença de formas juvenis de *Fasciola hepatica*. A migração das formas juvenis pelo tecido hepático produz trajetos hemorrágicos formados por tecido necrosado. Tais trajetos são visíveis macroscopicamente devido à cor avermelhada que acomete o tecido em questão, porém com o passar do tempo se tornam mais pálidos do que o parênquima ao redor. Pode ocorrer morte do animal como resultado da necrose hepática disseminada, causada pela migração de grande quantidade de formas imaturas do parasito, em caso de infecções maciças (El-Kouba, 2005) (Figura 4 A e B).

Na fase subaguda, metacercárias são ingeridas gradativamente. Enquanto algumas já atingiram os ductos biliares outras ainda estão migrando, provocando lesões de menor gravidade do que nas infecções maciças (Urquhart et al., 1996).

A fasciolíase crônica é a forma mais comum da doença. Durante esta fase, o fígado se apresenta pálido, com o lobo ventral de tamanho reduzido. Animais com fasciolíase crônica freqüentemente apresentam mau estado nutricional. Geralmente as características são infertilidade, anemia, perda de peso, queda na produção de leite e condenação do fígado no abate (Oakley et al., 1979).

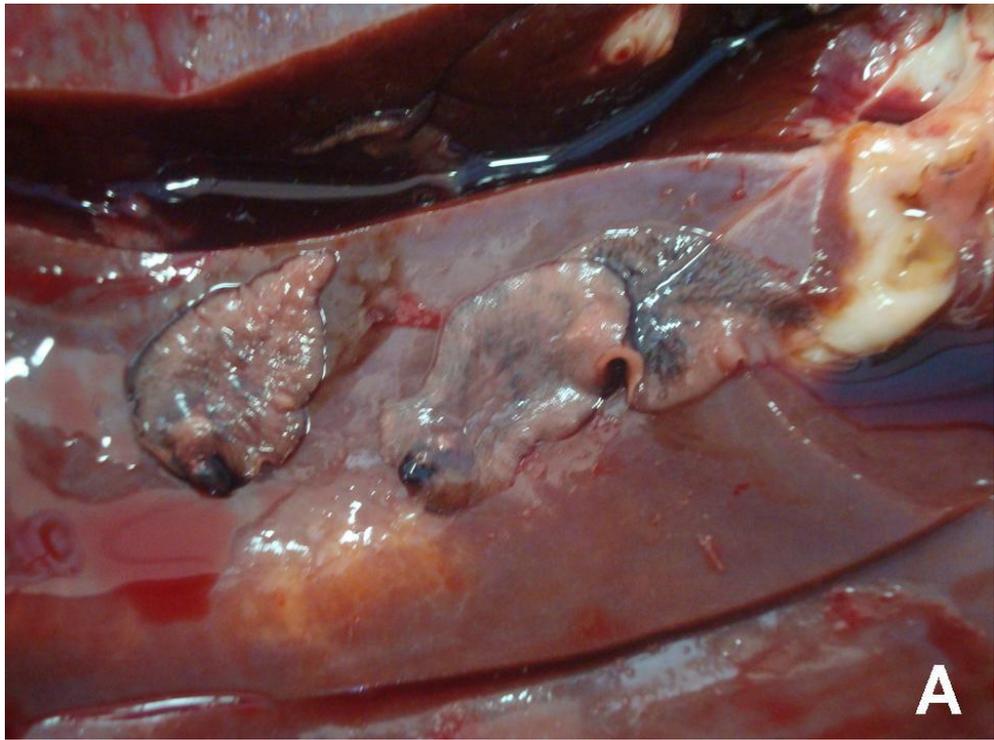


Figura 4: Espécimes de *Fasciola hepatica* coletados de fígado de bovino em abatedouro do município de Cordeiro/ RJ- Brasil. Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose/LHPV/ IOC/ Fiocruz.

## 1.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da fasciolíase em bovinos pode ser complexo, mesmo com a apresentação de sinais clínicos. Geralmente este diagnóstico é feito a partir da observação dos sintomas e outros fatores, como: ocorrência sazonal, clima da região, histórias prévias de fasciolíase na propriedade, ou identificação de habitats de moluscos (Alves, 2010). É necessário o exame de todos os animais do rebanho, pois alguns não apresentam sintomas, porém podem estar infectados (Borchert, 1981).

São várias as técnicas coproparasitológicas para a detecção de ovos de *Fasciola hepatica*, porém, estas possuem baixa sensibilidade, dificultando o diagnóstico da parasitose. A ausência de formas adultas no fígado do hospedeiro dificulta a existência de ovos nas fezes (Bernardo et al., 2011).

A técnica de quatro tamises metálicos (Girão & Ueno, 1994) é a mais utilizada para o encontro de ovos de *F. hepatica*. Diversos autores a utilizaram para a detecção da doença em bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos (Serra Freire & Nuernberg, 1992; Pile et al., 2000; Gomes et al., 2002). No entanto, durante um estudo realizado em 2008, comparando a sensibilidade das técnicas dos quatro tamises (Girão & Ueno, 1994) com sedimentação fecal (Foreyt, 2005) para detecção de ovos de *F. hepatica*, constatou-se que esta última foi mais sensível, simples e de menor custo (Martins et al., 2008).

Ainda que a presença do parasito seja confirmada pela presença dos ovos nas fezes, novas técnicas de detecção de antígenos vêm sendo utilizadas para diagnosticar a parasitose, principalmente em seu estágio inicial. No entanto, estas técnicas não substituem o diagnóstico por exame direto (Kleiman et al., 2005).

Alguns exames sorológicos para a detecção de anticorpos contra antígenos do trematódeo também têm sido utilizados, como por exemplo, o teste de ELISA (Urquhart et al., 1996).

## 1.8. TRATAMENTO

O tratamento mais eficaz e com menos efeitos colaterais é obtido com o anti-helmíntico Triclabendazole (Baruch, 1999; Rey, 2002). Tal medicamento atua tanto nas formas juvenis quanto nas formas adultas (Boray et al., 1983). Porém, diversos trabalhos relatam resistência do parasito a anti-helmínticos (Meaney et al., 2006; Toner et al., 2008).

O primeiro caso de resistência a Triclabendazole ocorreu na Austrália (Overend & Bowen, 1995), mas existem relatos em países da Europa, como: Irlanda (Anon, 1995), Escócia (Mitchell et al., 1998), Holanda (Moll et al., 2000), País de Gales (Thomas et al., 2000) e Espanha (Alvarez-Sánchez et al., 2006).

A utilização de anti-helmínticos deve ser feita com cautela, caso contrário, nossa capacidade de tratar esta parasitose com êxito será perdida (Mc Conville et al., 2008). Por isso, nos últimos anos, têm-se utilizado de estratégias que envolvam combinação de dois ou mais fármacos como forma de tratamento em animais de criação. Tal medida é considerada o melhor caminho para impedir a resistência do parasito à anti-helmínticos (Meaney et al., 2006).

## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos demonstram que as características morfométricas de vermes adultos e ovos de *F. hepatica* variam de acordo com a espécie do hospedeiro definitivo (Valero et al., 2001; Mas-Coma, 2004).

A morfologia tem sido o critério mais usado para estudos sistemáticos sobre o gênero *Fasciola*. A microscopia de campo claro, aliada a técnicas de morfometria é uma técnica muito eficiente de comparação entre as espécies de *Fasciola* e subespécies de *F. hepatica* (Valero et al., 2005; Periago et al., 2006). Embora a morfologia seja um critério válido de evidencição do polimorfismo, ainda são poucos os estudos relacionados com *F. hepatica*.

A microscopia de varredura a laser confocal é uma técnica muito útil para a observação de estruturas internas e externas de *Fasciola hepatica* (Mair et al., 1998a; Mair et al., 1998b). Entretanto, na literatura existem poucos trabalhos que discutam a validade desta microscopia para a observação deste helminto, o que reforça a necessidade de pesquisas usando esta técnica. Embora haja relatos sobre o uso da técnica de contraste de interferência diferencial (DIC) com trematódeos (Muniz-Pereira et al., 2004), nenhum relata a utilização de tais técnicas para pesquisas em *F. hepatica*.

O estudo do tegumento, com a microscopia eletrônica de varredura também é importante, pois ele é a interface entre o parasito e o meio ambiente e é a rota principal para a entrada de compostos no parasito, além de desempenhar proteção contra o ataque do sistema imunológico e a ação dos anti-helmínticos (McConville et al., 2008).

Com este trabalho, esperamos auxiliar na descrição das alterações morfológicas e morfométricas que ocorrem em ovos e vermes adultos de *F. hepatica* obtidos de bovinos naturalmente infectados em relação a diferentes áreas geográficas (Cordeiro - Rio de Janeiro, Brasil; Lavras - Minas Gerais, Brasil; Catamarca e Salta, Argentina) e avaliar as diferentes técnicas de microscopia empregadas neste estudo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar a morfologia e morfometria de ovos e vermes adultos de *F. hepatica* provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas (Cordeiro – RJ, Brasil; Lavras – MG, Brasil; Catamarca e Salta, Argentina).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar estudos morfológicos de espécimes provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas: Cordeiro - Rio de Janeiro, Lavras – Minas Gerais e províncias de Catamarca e Salta – Argentina, utilizando microscopia de campo claro, com contraste de interferência diferencial e microscopia confocal de varredura a laser;
- Realizar estudos da topografia da superfície de espécimes provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas: Cordeiro – Rio de Janeiro, Lavras – Minas Gerais e províncias de Catamarca e Salta – Argentina utilizando a microscopia eletrônica de varredura;
- Realizar estudos morfométricos de espécimes provenientes de bovinos de diferentes áreas geográficas: Cordeiro – Rio de Janeiro, Lavras – Minas Gerais e províncias de Catamarca e Salta – Argentina.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Áreas de estudo

O município de Cordeiro pertence à região serrana do Estado do Rio de Janeiro. Possui uma população estimada de 20.965 habitantes. A cidade possui a criação de bovinos como uma das principais atividades econômicas. O município se localiza a uma latitude de 22°01'43" e a uma longitude de 42°21'39". O clima de Cordeiro é do tipo tropical de altitude, dominante nas regiões serranas brasileiras. (IBGE, 2010).

O município de Lavras pertence à região do campo das vertentes, no sul do estado de Minas Gerais e possui população de aproximadamente 92.200 habitantes. Seu clima é classificado como tropical de altitude. A produção agropecuária se destaca pelas plantações de café e criação de gado. Localiza-se a uma latitude de 21°14' e a uma longitude de 45°00' (IBGE, 2010).

A província de Salta localiza-se a 1.616 km da cidade de Buenos Aires. Seu clima se define como subtropical serrano com estação seca ([www.turismo.salta.gov.ar/home](http://www.turismo.salta.gov.ar/home)). Possui latitude de 24°51'S e longitude de 65°29'W ([www.salta.climatemps.com/](http://www.salta.climatemps.com/)).

A província de Catamarca se situa no Noroeste da Argentina. O clima é caracterizado como temperado-continental. Sua população é de cerca de 332.390 habitantes. Sua latitude é de 25°12'S e sua longitude é de 69°03'W ([www.catamarca.gov.ar](http://www.catamarca.gov.ar)).

Todas as amostras deste estudo consistem em espécimes adultos coletados de bovinos em abatedouros naturalmente infectados, provenientes dos municípios de Cordeiro (Rio de Janeiro) e Lavras (Minas Gerais), no Brasil e das províncias de Salta e Catamarca, na Argentina. Em Cordeiro, os espécimes foram coletados pelo próprio grupo. Os espécimes oriundos de Lavras foram cedidos pela Universidade Federal de Lavras. As amostras provenientes das províncias de Salta e Catamarca foram cedidas pelo Instituto Nacional de Enfermidades Infecciosas da Argentina.

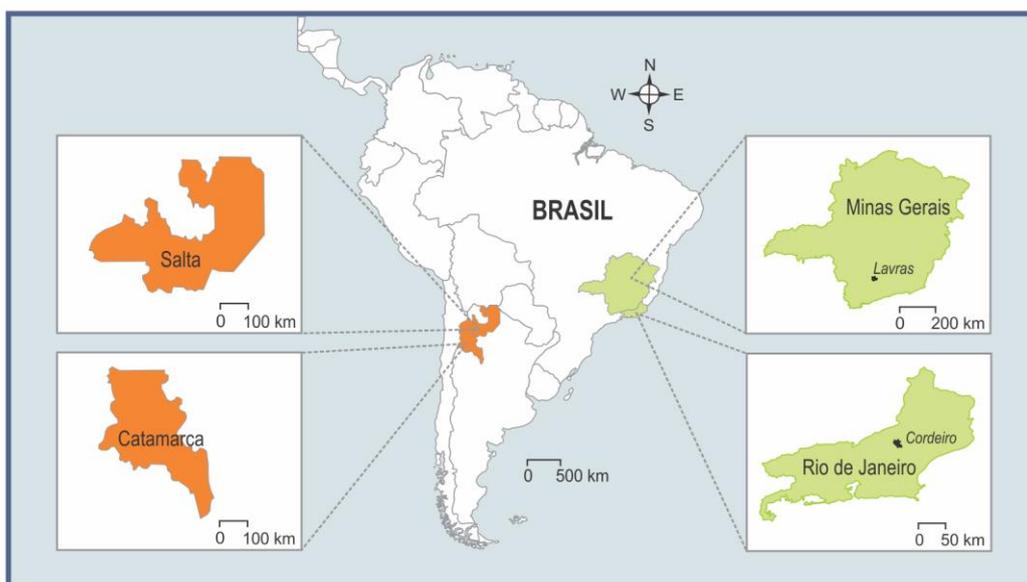


Figura 5: Mapa da América do Sul evidenciando as áreas de procedência do material estudado (Ilustração: Heloisa Diniz – Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC – Fiocruz).

## 4.2. Preparo das amostras

Para a microscopia de campo claro, a microscopia com contraste de interferência diferencial (DIC) e a microscopia de varredura a laser confocal (MVLC), foi utilizado um total de 84 espécimes.

Os espécimes adultos foram fixados, prensados entre placas de vidro, para facilitar a visualização das estruturas, e corados com Carmim Alcoólico de Langeron (1949). Logo após, foi realizada a desidratação destas amostras em uma série ascendente de etanóis e a clarificação foi feita com uma solução de Salicilato de Metila e Bálsamo do Canadá, na proporção 1:1. O material foi montado entre lâminas e estas foram preenchidas com Bálsamo do Canadá (Figura 6). A metodologia foi baseada no protocolo proposto por Valero et al. (2005).

Para a microscopia eletrônica de varredura os espécimes foram fixados em AFA (Ácido Acético, Formol, Álcool), desidratados em uma série ascendente de alcoóis, secados com carbono, montados no suporte de alumínio e cobertos por metal de ouro. Esta técnica foi adaptada da proposta apresentada por Keiser & Morson (2008).

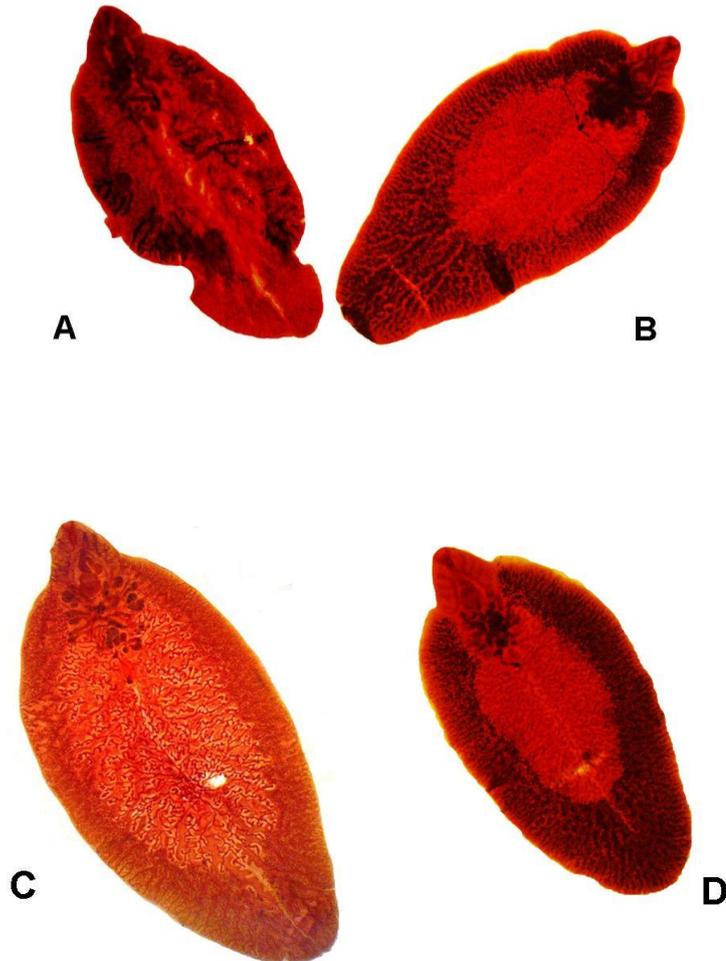


Figura 6: Espécimes de *Fasciola hepatica* corados com carmim alcoólico de Langeron. Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose. (A) Espécime proveniente de Catamarca - Argentina. (B) Espécime proveniente de Cordeiro - RJ. (C) Espécime proveniente de Lavras - MG. (D) Espécime proveniente de Salta – Argentina.

#### 4.3. Análise Morfométrica e Morfológica

Para a análise morfométrica, as amostras foram analisadas em um microscópio de campo claro da Nikon. As imagens foram obtidas em câmera digital e processadas em um analisador digital de imagens equipado com o software Elements AR. As características biométricas medidas no verme adulto foram selecionadas de acordo com Valero et al. (2005). Foram medidos os seguintes caracteres: comprimento do corpo (CT), largura do corpo (LT), razão entre comprimento e largura do corpo (CT/LT), comprimento do cone (CC), largura do cone (LC), ventosa oral (VO), ventosa ventral (VV) e distância entre ventosa oral e ventosa ventral (VO-VV) (Figura 7). O estudo morfométrico dos ovos foi realizado em diferentes regiões do útero e incluiu: comprimento (CO), largura (LO) e área (A) (Figura 8).

Para a análise morfológica, fotomicrografias foram obtidas do microscópio de campo claro (Olympus BX51) utilizando o DIC. Para os estudos de microscopia de varredura a laser confocal (MVLC), os espécimes foram observados em um microscópio Nikon C2Si, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Para a microscopia eletrônica de varredura, os espécimes foram estudados em um microscópio Quanta 250, pertencente à plataforma de microscopia do CENABIO (UFRJ).

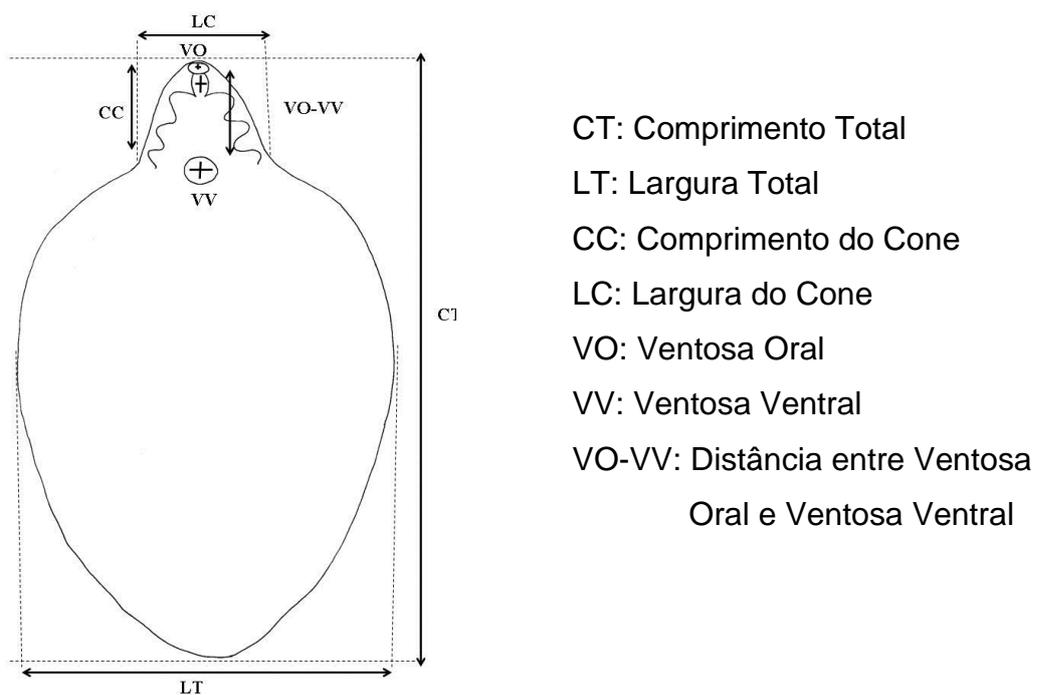


Figura 7: Desenho esquemático dos caracteres utilizados na morfometria de espécimes adultos de *Fasciola hepatica*, de acordo com Valero et al. (2005).

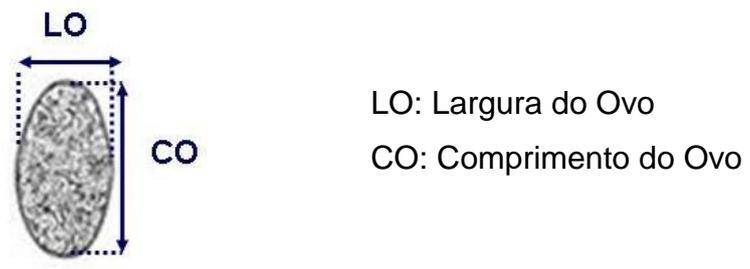


Figura 8: Desenho esquemático dos caracteres utilizados na morfometria de ovos de *Fasciola hepatica*, de acordo com Valero et al. (2005).

#### **4.4. Análise estatística**

Foi realizada pelo *software* GraphPad instat. A definição do tamanho da amostra foi feita pelo Normality Test KS (Kolmogorov – Smirnof Normality Test). Os dados foram submetidos à análise de variância – Anova, utilizando o pós-teste de Tukey, considerando os valores de  $p \leq 0,05$  como de significância estatística (Vieira, 1991).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Morfologia**

#### **5.1.1. Microscopia de campo claro**

Com a microscopia de campo claro, foram analisados 84 espécimes. Todos os espécimes de todas as localidades possuíam o corpo foliáceo, achatado dorso-ventralmente, com o cone cefálico bem evidente localizado na porção anterior do corpo do parasito.

A ventosa oral, arredondada, está localizada no ápice do cone, seguida por faringe e esôfago musculosos. O esôfago bifurca-se em dois cecos intestinais bastante ramificados, dos quais surgiam ramificações secundárias. Os cecos intestinais se estendiam até a porção final do corpo do parasito.

A ventosa ventral estava localizada na região mediana do corpo, próxima ao aparelho reprodutivo e seu tamanho era maior do que a ventosa oral.

O sistema reprodutor masculino apresentava testículos ramificados, localizados um adiante do outro, não atingindo a região final nem as margens laterais do corpo, tendo as glândulas vitelínicas como. O cirro, bem constituído, foi observado próximo à ventosa ventral. O sistema reprodutor feminino é constituído de ovário ramificado, oviduto e útero repleto de ovos. As glândulas vitelínicas estavam posicionadas na lateral do corpo e altamente ramificadas, estendendo-se desde a região da ventosa ventral até a extremidade posterior do corpo. A glândula de Mehlis, localizada próximo ao ovário, na região mediana do corpo, estava bem evidenciada.

Os espécimes provenientes de Cordeiro/RJ – Brasil (Figura 9), Catamarca (Figura 10) e Salta (Figura 11) – Argentina apresentavam tegumento coberto por espinhos. Estes espinhos estavam direcionados no sentido posterior do corpo. Nos espécimes oriundos de Lavras/MG – Brasil (Figura 12), não foi possível a visualização dos espinhos no tegumento.

Os ovos, presentes em grande quantidade no interior do útero dos espécimes, apresentavam formato oval.

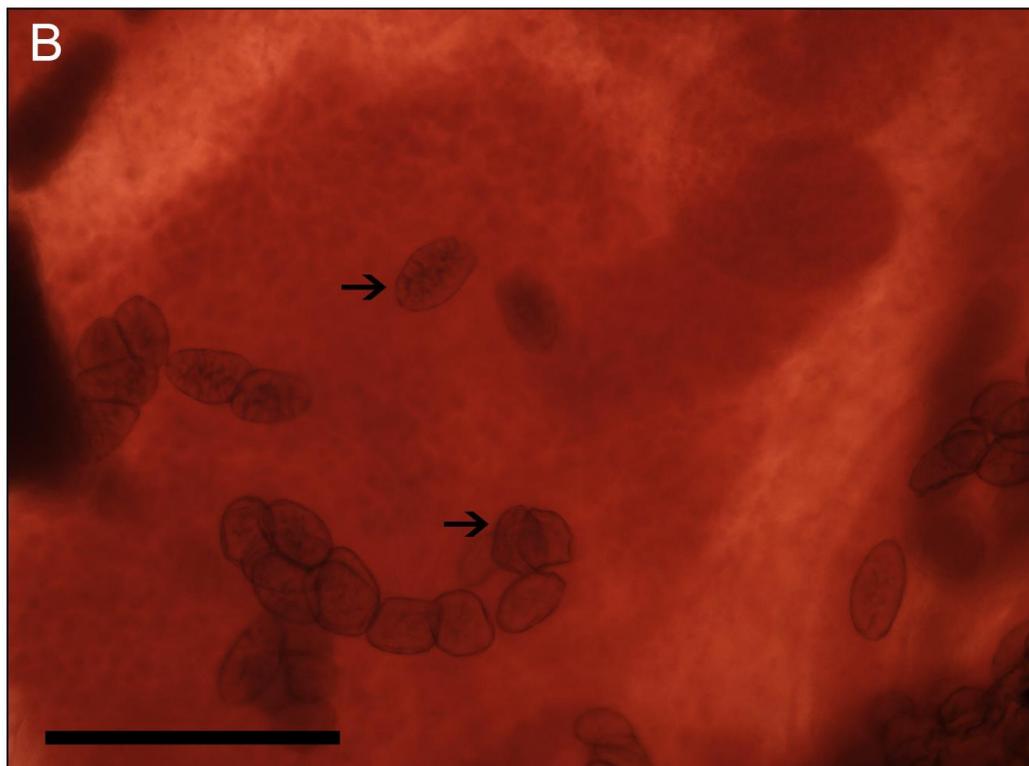
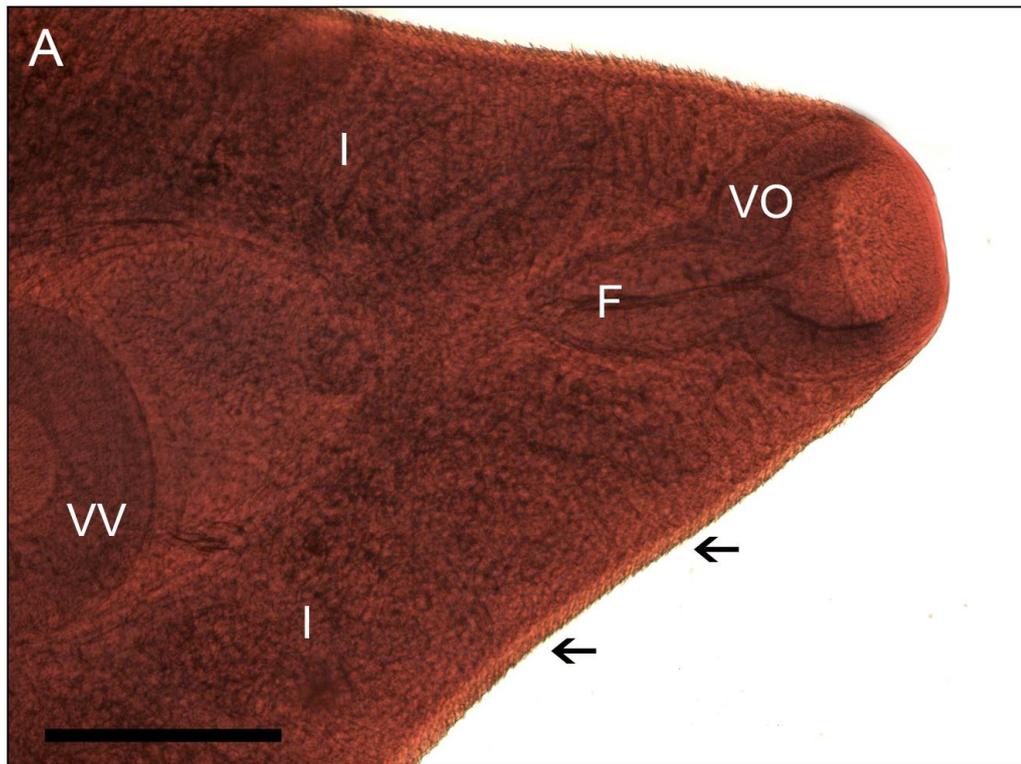


Figura 9: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Cordeiro - RJ visualizada na microscopia de campo claro. (A) Cone cefálico. **VO**, ventosa oral; **I**, cecos intestinais; **F**, faringe; **VV**, ventosa ventral; espinhos (**setas**). Aumento 4x. (B) Útero repleto de ovos (**setas**). Aumento 10x.

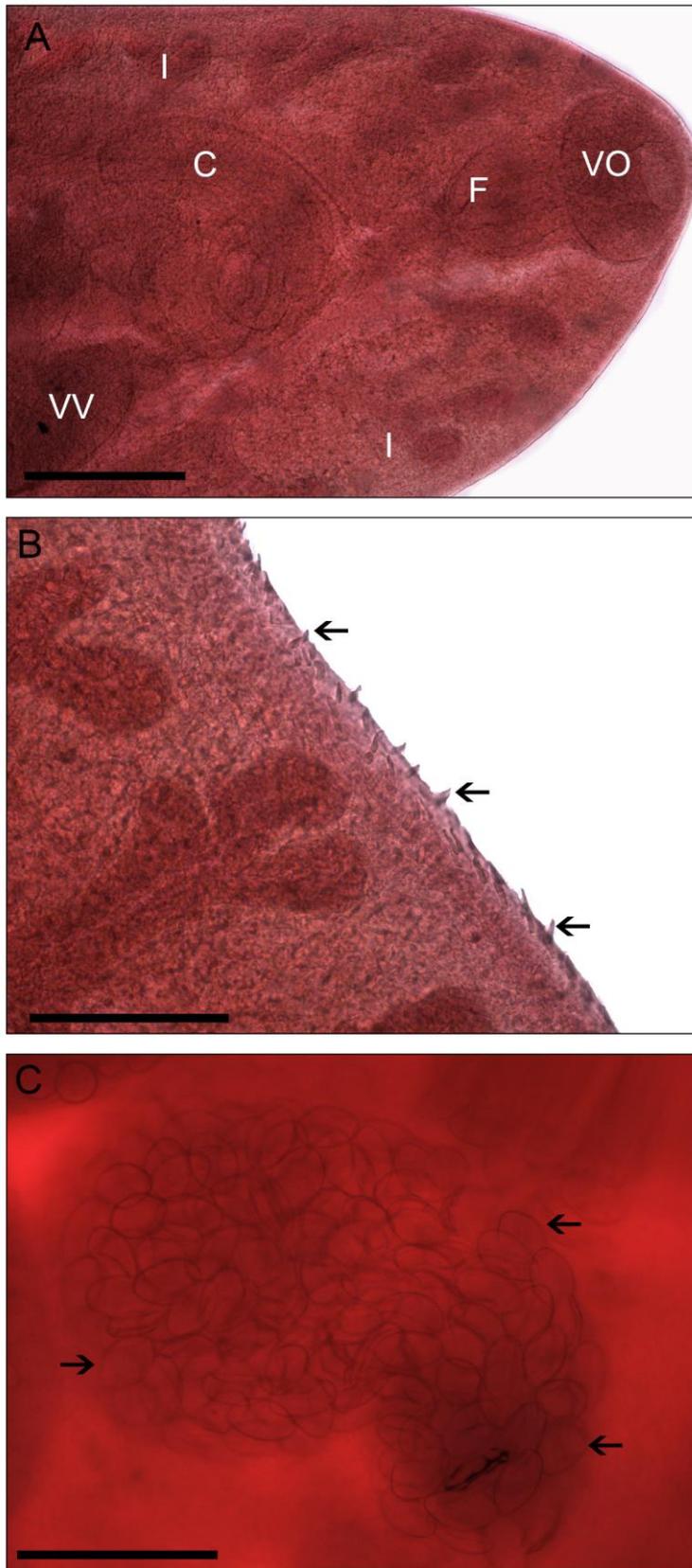


Figura 10: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos da província de Catamarca - Argentina visualizada na microscopia de campo claro. (A) Cone cefálico. **VO**, ventosa oral; **I**, cecos intestinais; **F**, faringe; **C**, cirro; **VV**, ventosa ventral. Aumento 4x. (B) Útero repleto de ovos (**setas**). (C) Detalhe do cone cefálico evidenciando os espinhos (**setas**); **I**, cecos intestinais. Aumento 10x.

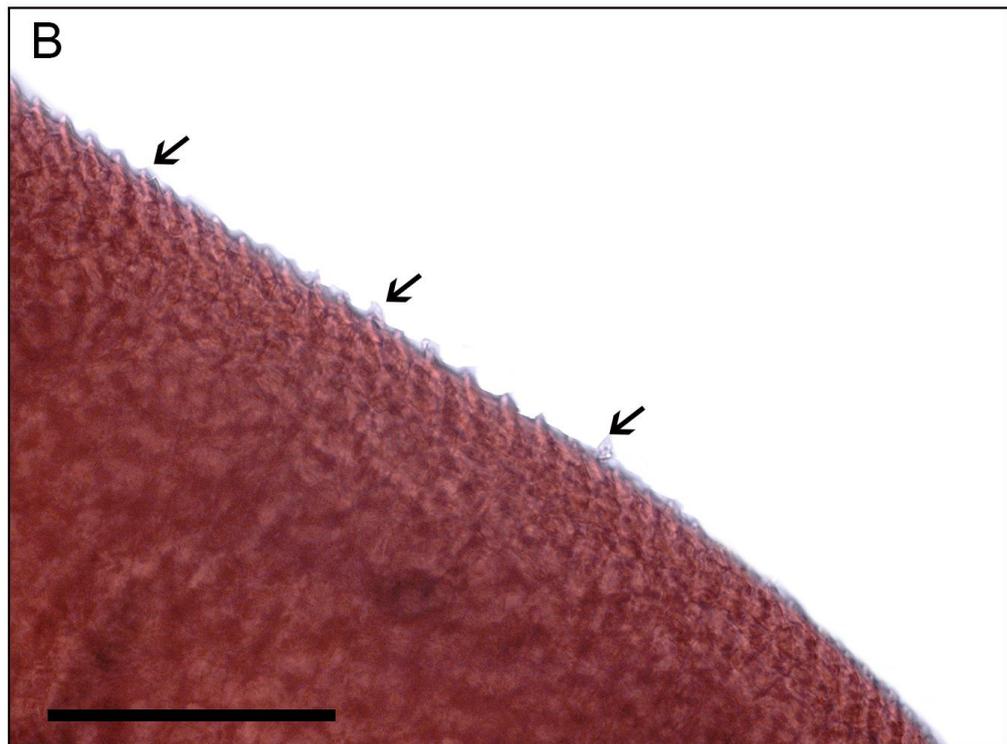
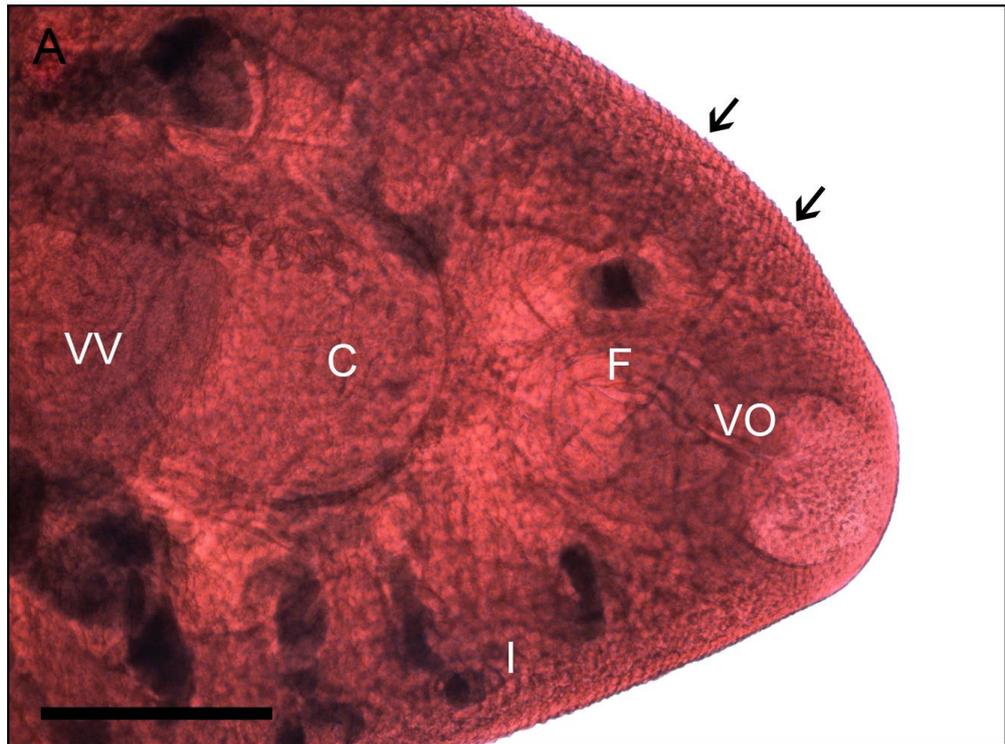


Figura 11: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos da província de Salta - Argentina visualizada na microscopia de campo claro. (A) Cone cefálico. **VO**, ventosa oral; **I**, cecos intestinais; **F**, faringe; **C**, cirro; **VV**, ventosa ventral; espinhos na margem do tegumento (**setas**). Aumento 4x. (B) Detalhe do cone cefálico evidenciando os espinhos (**setas**). Aumento 10x.

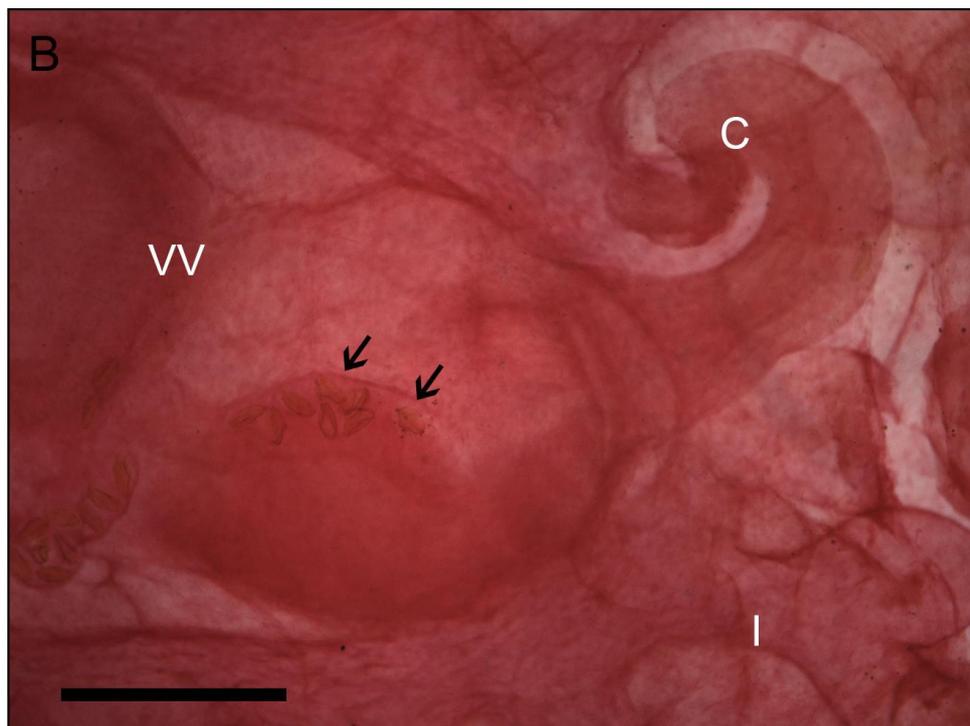


Figura 12: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Lavras - MG visualizada na microscopia de campo claro. (A) Cone cefálico. **VO**, ventosa oral; **I**, cecos intestinais; **F**, faringe; **E**, esôfago; **C**, cirro. Aumento 4x. (B) Útero repleto de ovos (**setas**); **C**, Cirro; **I**, cecos intestinais; **VV**, ventosa ventral. Aumento 10x.

### 5.1.2. Microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial

Para esta técnica, foram utilizados 23 espécimes, no total. Nos espécimes de todas as localidades foi possível visualizar os espinhos no tegumento. Nos espécimes de Cordeiro (Figura 13) e Salta (Figura 14), estes espinhos estavam em maior quantidade, diferente dos espécimes de Catamarca (Figura 15) e Lavras (Figura 16), nos quais foram vistos poucos espinhos, com esta técnica.

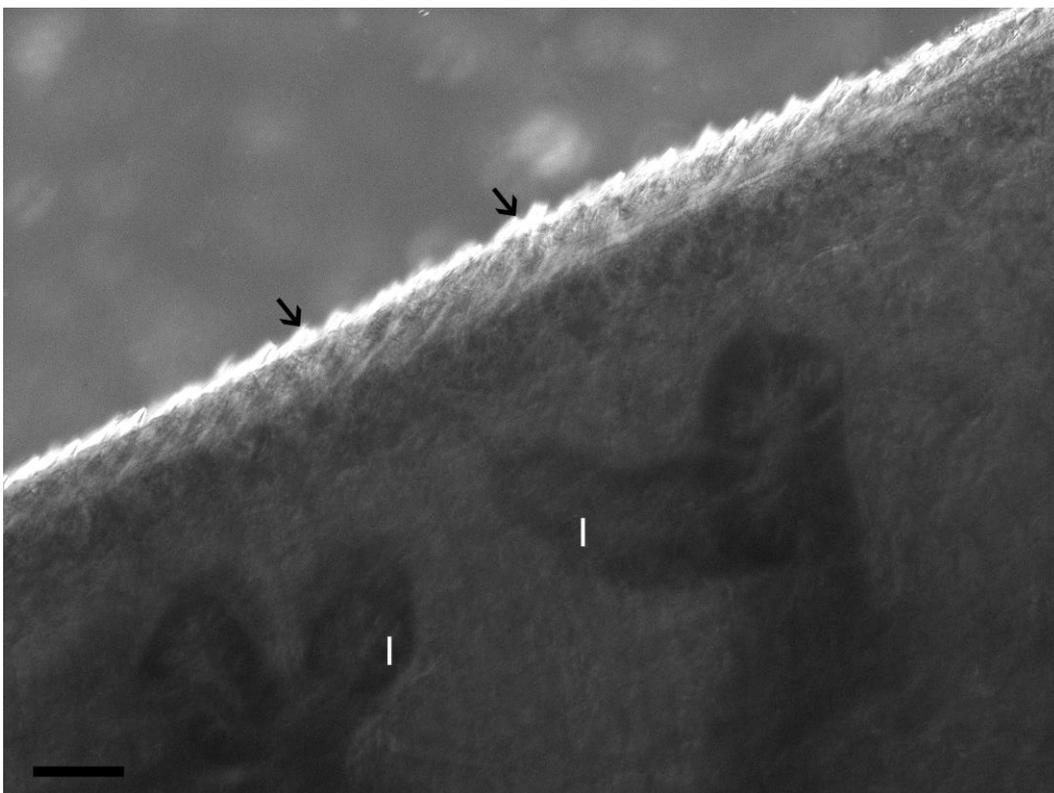


Figura 13: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Cordeiro - RJ visualizada na microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial. Porção final do cone cefálico, evidenciando os espinhos (**setas**) e **I**, cecos intestinais.

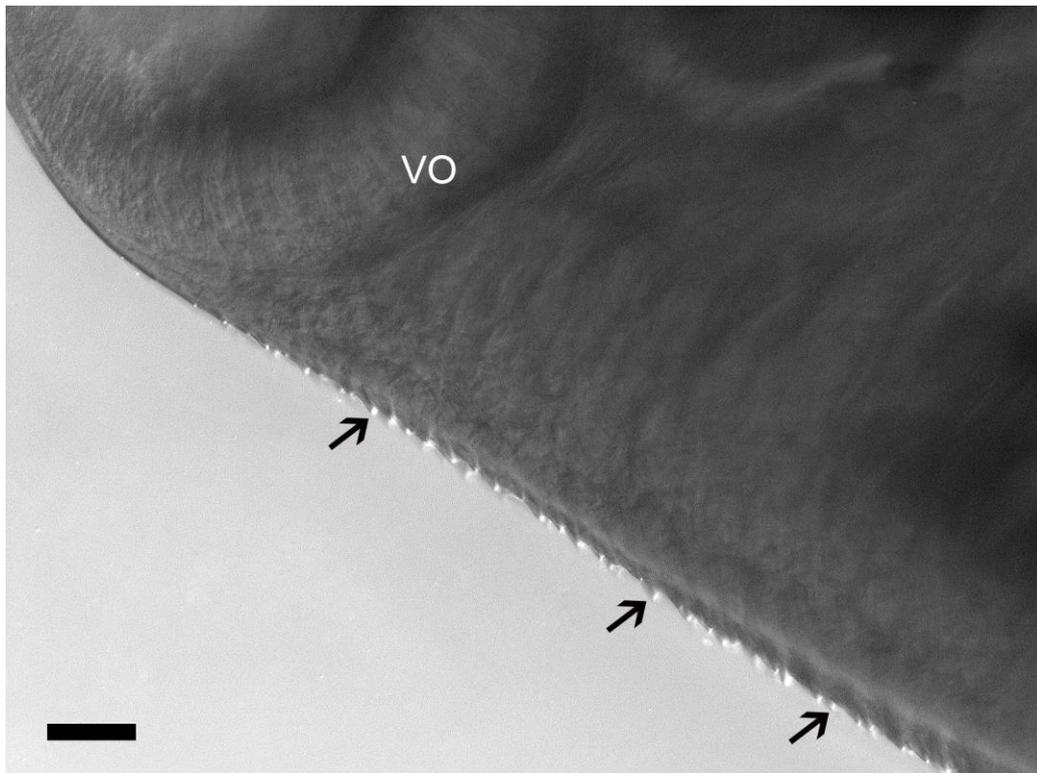


Figura 14: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos da província de Salta – Argentina, visualizada na microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial. Porção final do cone cefálico, evidenciando os espinhos (**setas**); **VO**, ventosa oral.

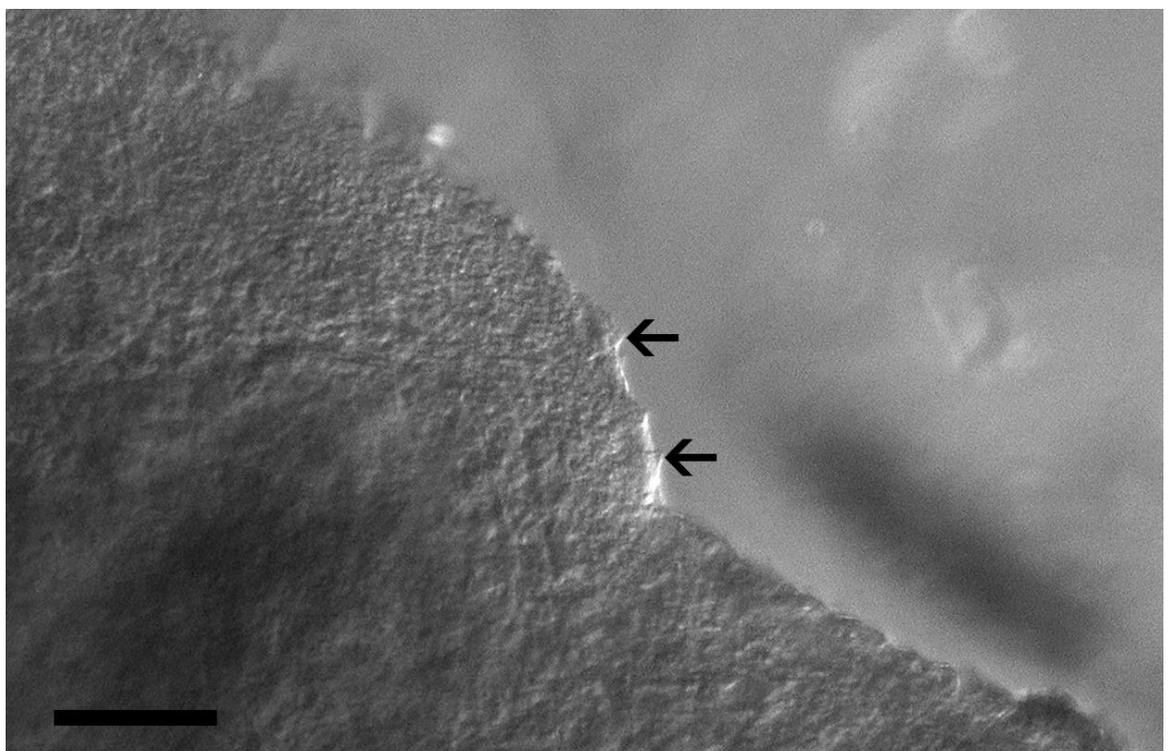


Figura 15: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos da província de Catamarca - Argentina visualizada na microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial. Porção final do cone cefálico, evidenciando: espinhos (**setas**).

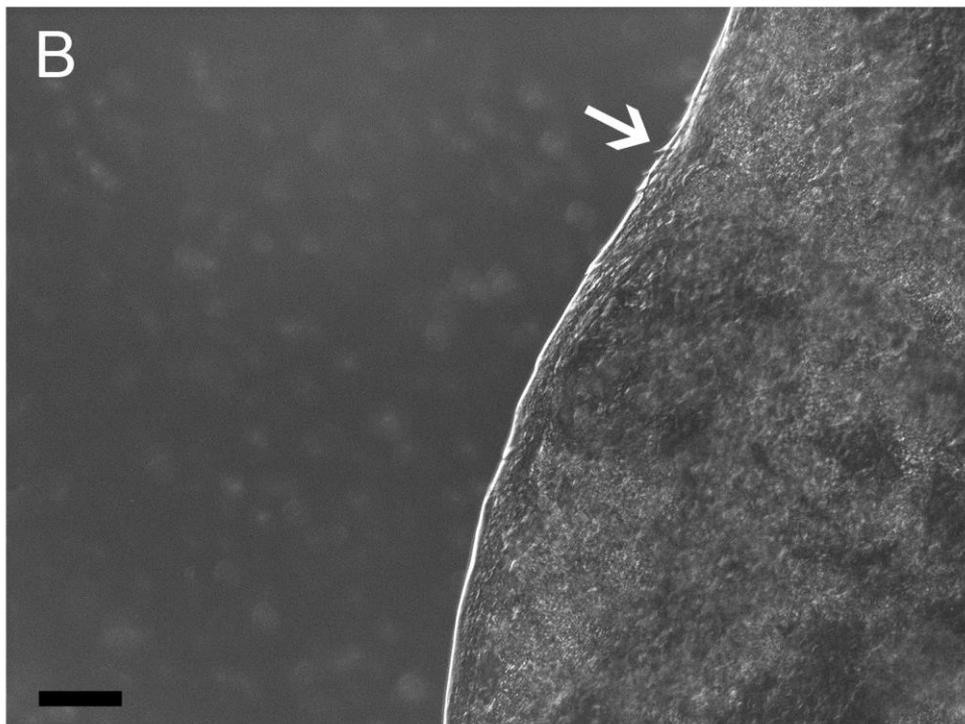
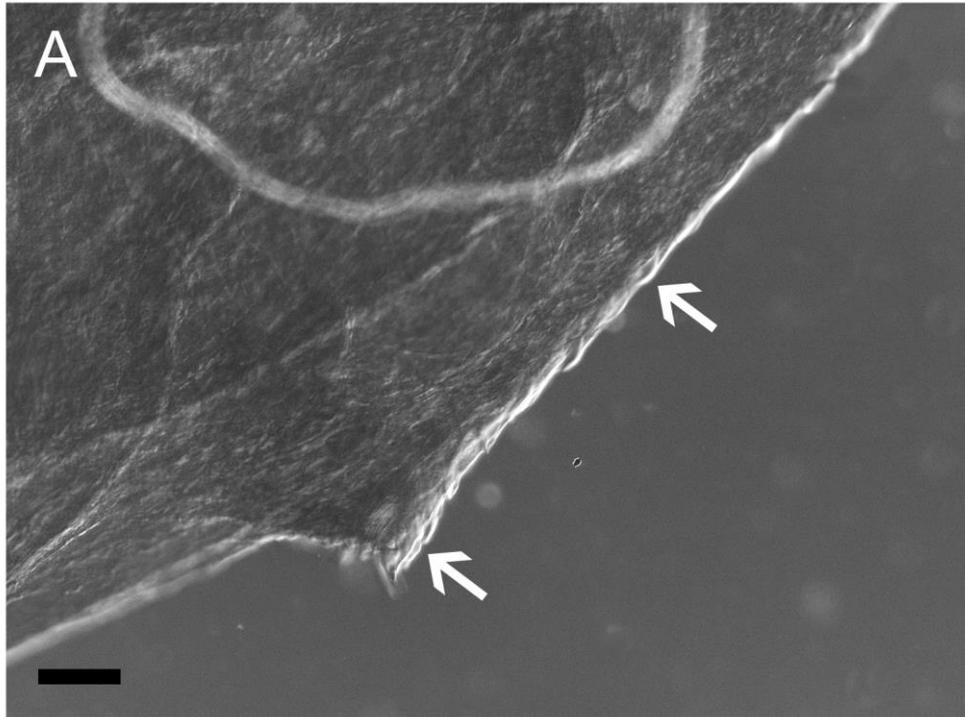


Figura 16: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Lavras - MG visualizada na microscopia de campo claro com contraste de interferência diferencial. (A, B) Porção final do cone cefálico, evidenciando os espinhos (**setas**); e I, cecos intestinais.

### 5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

Foram observados 8 espécimes no total, sendo quatro provenientes de Cordeiro, um de Lavras e três de Catamarca. Não foi possível realizar a técnica para os espécimes de Salta, pois o tegumento dos parasitos estava muito degradado.

Os espécimes de Catamarca apresentaram o cirro exteriorizado, podendo ou não apresentar espinhos. Quando presentes, os espinhos possuíam formato de escamas por toda a superfície e estavam em maior quantidade na região lateral do corpo, podendo estar presentes também na região próxima ao cirro. Numa visão lateral do espécime, pôde-se observar a ventosa ventral e o gonoporo. Havia espinhos na região dorsal do cone e próximo à ventosa ventral (Figura 17: A e B).

Nos espécimes de Cordeiro, observa-se a ventosa oral fortemente muscular, sem espinhos. O cone estava repleto de espinhos em forma de escamas, alguns pontiagudos. Não foi possível a visualização do cirro, pois este não estava exteriorizado. Quando analisamos a região lateral do corpo, foi observado que os espinhos mantinham o formato de escama (Figura 18: A e B). Na ventosa ventral, muscular, foram observados espinhos (Figura 19: A e B).

Os espécimes de Lavras apresentaram ventosa oral localizada no ápice do cone. Os espinhos estavam presentes por todo o tegumento, porém com tamanho reduzido e sua forma era similar a escamas (Figura 20: A e B).

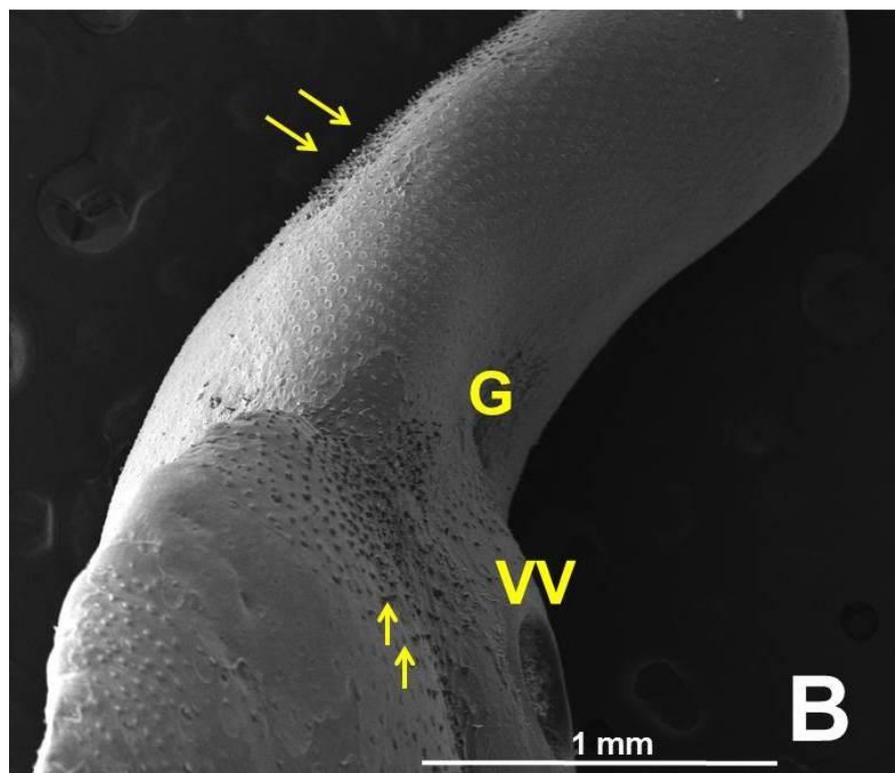
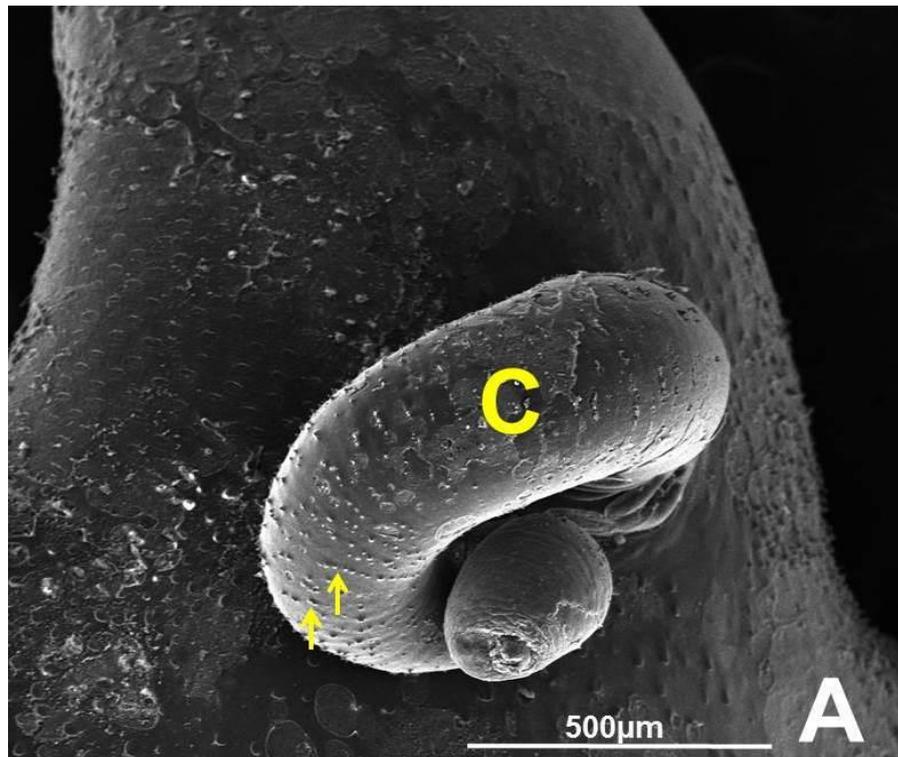


Figura 17: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos da província de Catamarca - Argentina visualizada na microscopia eletrônica de varredura. (A) Cone cefálico: **C**, cirro; espinhos (**setas**) no cirro. (B) Visão lateral do cone cefálico: **G**, gonoporo; **VV**, ventosa ventral; espinhos (**setas**).

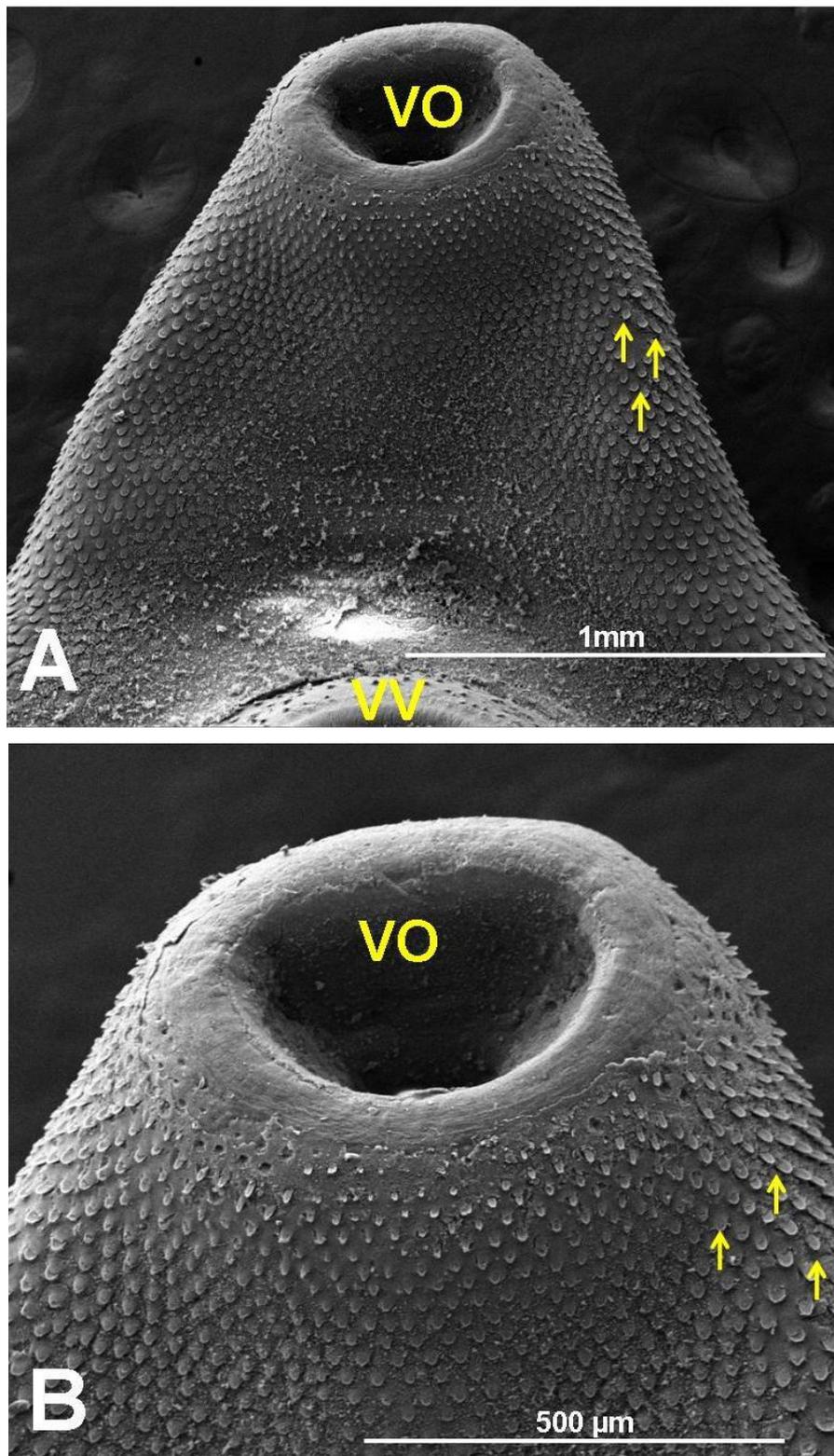


Figura 18: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Cordeiro - RJ visualizada na microscopia eletrônica de varredura. (A) Cone cefálico; **VO**, ventosa oral; **VV**, ventosa ventral; espinhos (**setas**). (B) Detalhe do cone cefálico evidenciando: **VO**, ventosa oral; espinhos (**setas**).

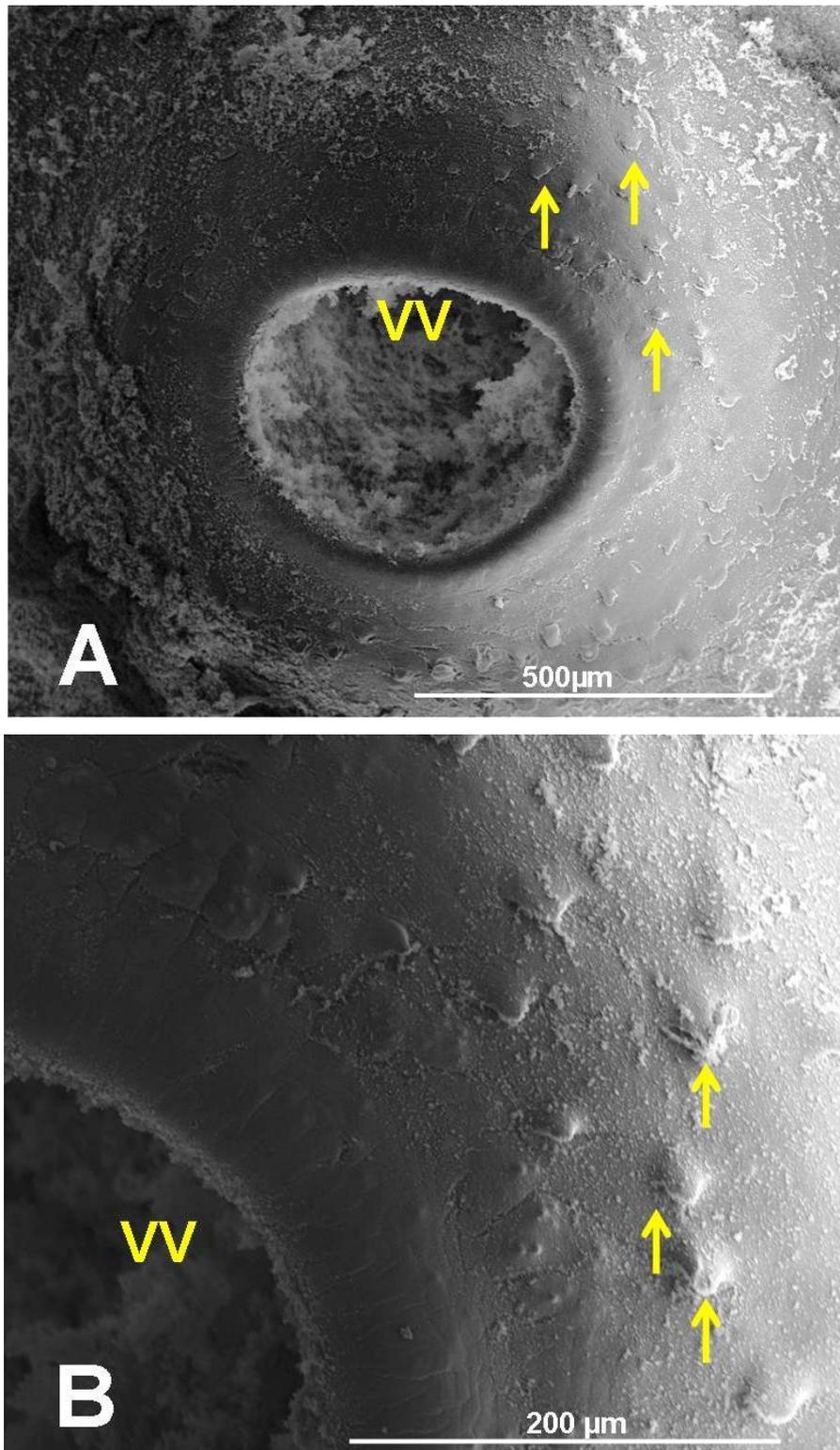


Figura 19: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Cordeiro - RJ visualizada na microscopia eletrônica de varredura. (A) **VV**, ventosa ventral; espinhos (**setas**). (B) **VV**, ventosa ventral, evidenciando os espinhos (**setas**) na estrutura.

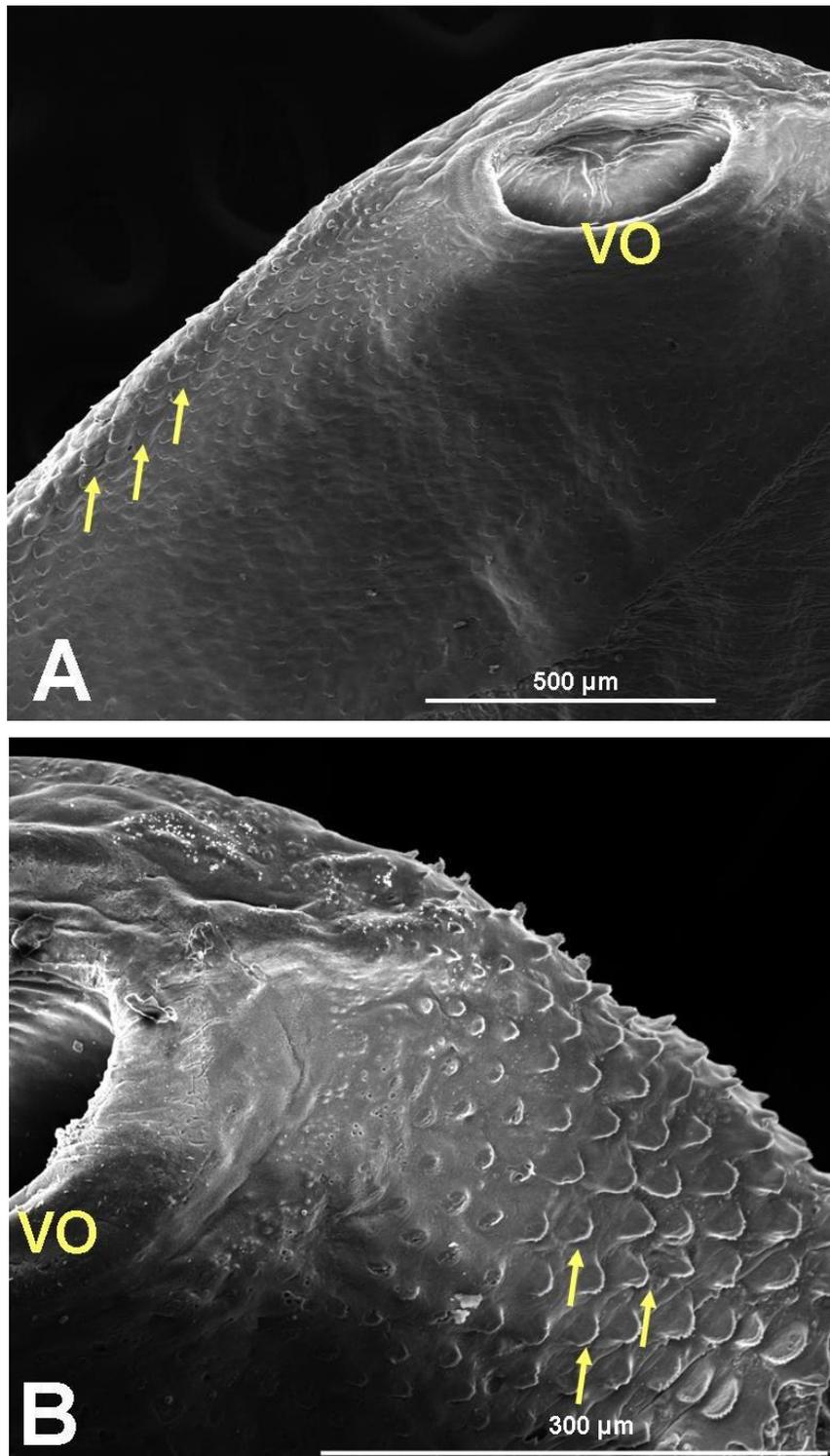


Figura 20: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Lavras - MG visualizada na microscopia eletrônica de varredura. (A) Cone cefálico: VO, ventosa oral; espinhos (**setas**). (B) Detalhe do cone cefálico evidenciando: VO, ventosa oral; espinhos (**setas**).

#### **5.1.4 Microscopia confocal de varredura a laser**

Os espécimes de Cordeiro apresentaram o cone cefálico com grande quantidade de espinhos no tegumento que, assim como os feixes musculares, estavam no sentido longitudinal (Figura 21a e c). A ventosa oral se mostrou fortemente muscular, sendo possível ver a direção dos feixes musculares (Figura 21b). O gonoporo foi visualizado, abaixo da ventosa oral. Na região próxima ao gonoporo foi possível observar os feixes musculares, que mostraram diversos sentidos (longitudinal, diagonal e horizontal). A ventosa ventral mostrou-se intensamente muscular, sendo possível visualizar os feixes musculares numerosos na estrutura (Figura 21d). Não foi possível visualizar o cirro nos espécimes analisados.

Nos espécimes de Catamarca, foi possível visualizar a faringe e a ventosa oral fortemente muscular, com os feixes musculares bem definidos (Figura 22a e b). Foi possível ver o cirro, com numerosos espinhos de tamanho reduzido e formato pontiagudo. Estes são diferentes dos espinhos que se localizam ao redor do cirro, que são maiores e com ponta robusta. Foram visualizados, também, os feixes musculares situados na região do cirro (Figura 22c e d). A região lateral do cone cefálico apresentou espinhos, mostrando também os ramos intestinais (Figura 23a). Foram observados ovos no interior do útero dos espécimes desta localidade (Figura 23b).

Os espécimes provenientes de Salta apresentaram a ventosa oral intensamente muscular, sendo possível verificar os feixes musculares e, logo após, a faringe (Figura 21a). Foi possível verificar o cirro, no qual não foram achados espinhos (figura 24b). Na ventosa ventral foi notada a presença de espinhos, porém em pequena quantidade (Figura 24c)> Foi observada, também, a região mediana do corpo do parasito e notou-se a presença de espinhos em sua margem (Figura 24d). Não foi possível visualizar os ovos no útero destes espécimes, com esta técnica.

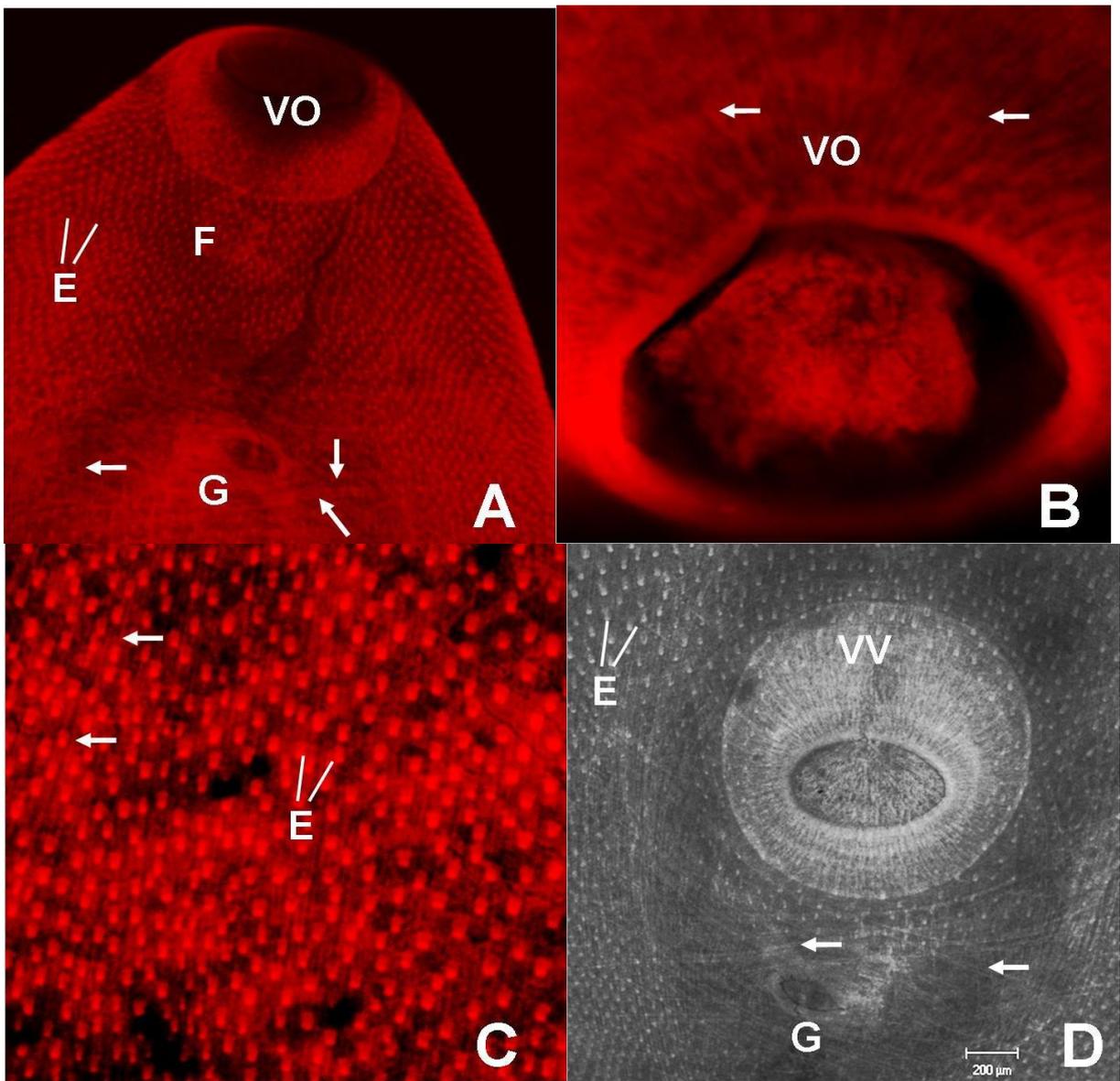


Figura 21: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Cordeiro - RJ visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser. (A) Cone cefálico: **VO**, ventosa oral; **F**, faringe; **G**, gonoporo; **E**, espinhos; feixes musculares (**setas**). (B) **VO**, ventosa oral, evidenciando os feixes musculares (**setas**). (C) Região do cone mostrando os espinhos (**E**) e a direção longitudinal (**setas**) dos feixes musculares. (D) Região próxima à ventosa ventral (**VV**) e gonoporo (**G**), mostrando os feixes musculares (**setas**) ao redor da estrutura; **E**, espinhos.

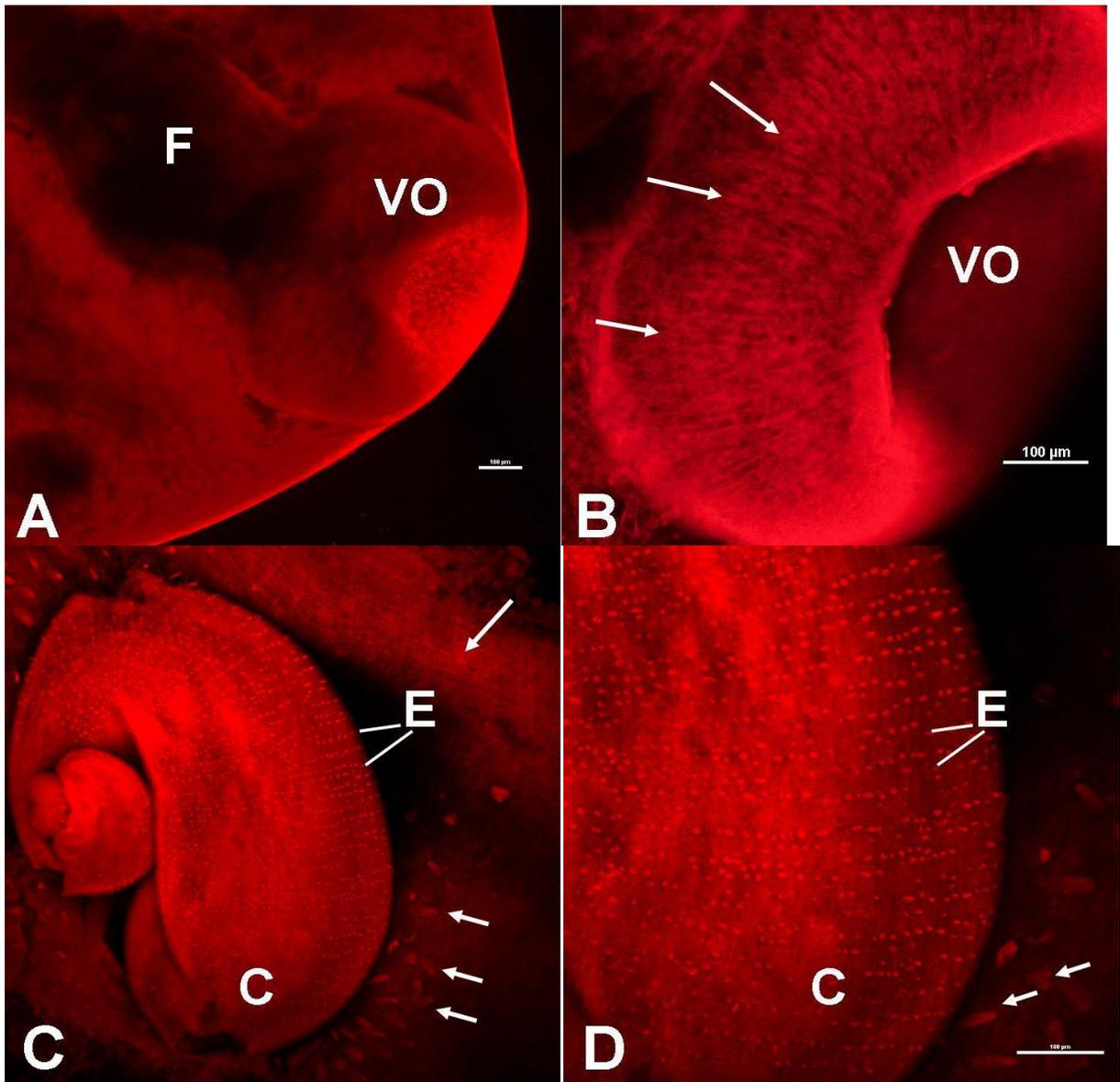


Figura 22: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos da província de Catamarca - Argentina visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser. (A) Cone cefálico: **VO**, ventosa oral; **F**, faringe. (B) **VO**, ventosa oral evidenciando os feixes musculares (**setas**). (C) **C**, cirro repleto de espinhos (**E**), mostrando os feixes musculares ao redor da estrutura (**setas**). (D) Detalhe do cirro (**C**) evidenciando os espinhos (**E**). (E) Visão lateral do cone cefálico, mostrando os espinhos (**setas**). (F) Útero repleto de ovos (**setas**).

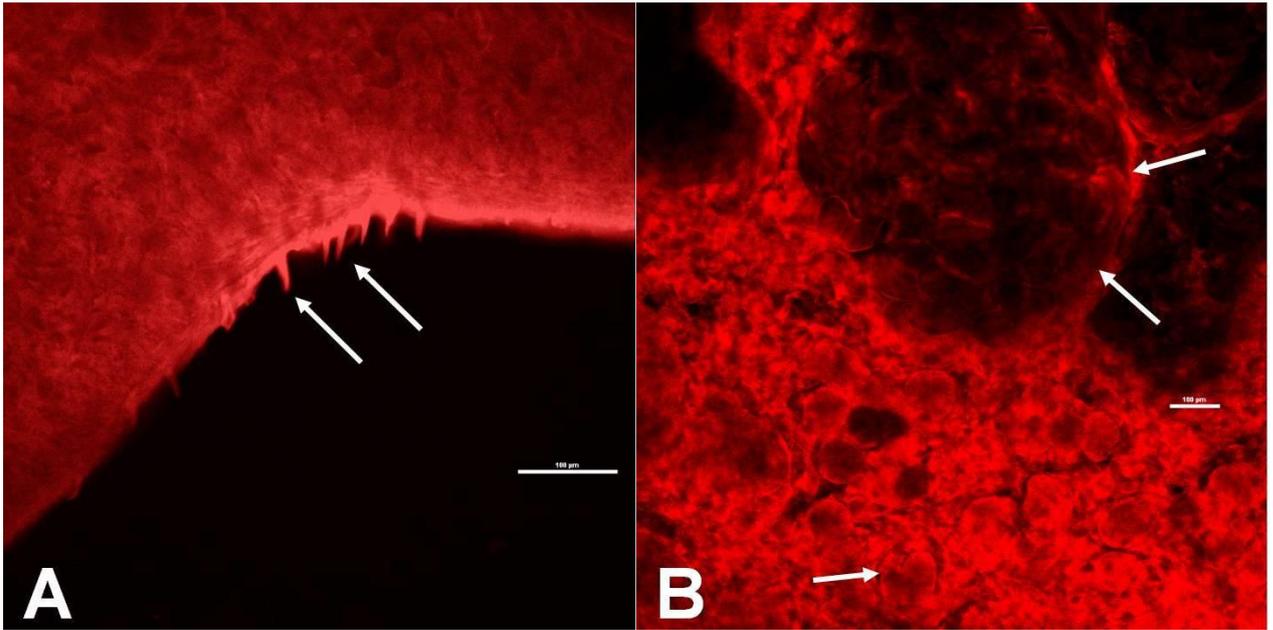


Figura 23: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos da província de Catamarca - Argentina visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser. (A) Visão lateral do cone cefálico, mostrando os espinhos (**setas**). (B) Útero repleto de ovos (**setas**).

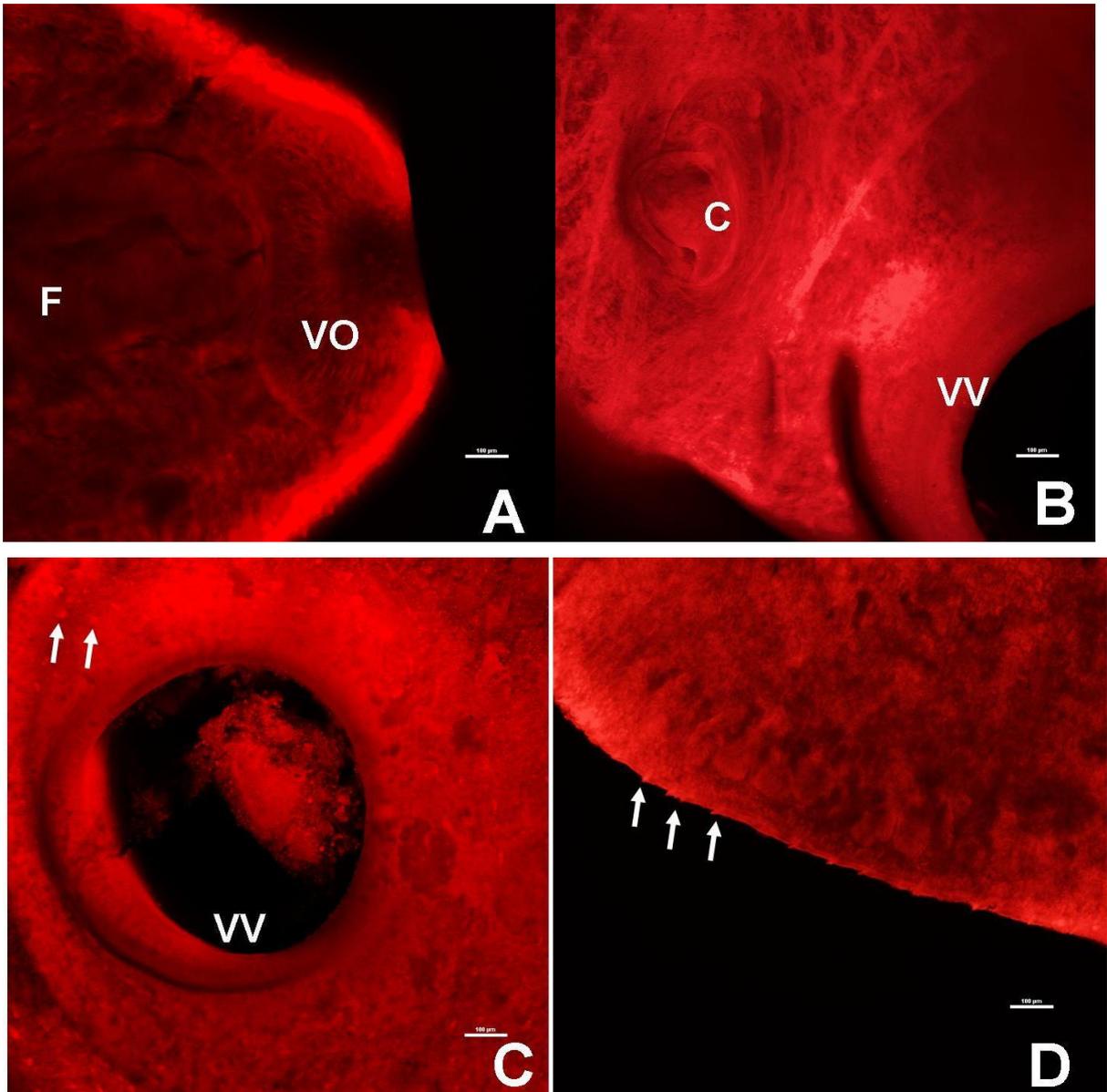


Figura 24: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos da província de Salta – Argentina, visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser. (A) Cone cefálico: **VO**, ventosa oral; **F**, faringe. (B) Região do cirro (**C**), próximo à ventosa ventral (**VV**). (C) Detalhe da ventosa ventral (**VV**), evidenciando os espinhos (**setas**) nas estruturas. (D) Detalhe da região mediana do corpo evidenciando os espinhos tegumentares (**setas**).

Os espécimes de Lavras apresentaram ventosas oral e ventral musculares (Figura 25c e d), onde pôde-se notar os feixes musculares bem evidentes. Foi possível observar, também, o cirro, no qual não foram visualizados espinhos (Figura 25a). No tegumento do parasito foi possível observar os feixes musculares, apresentando aspecto de “rede” e os espinhos inseridos no tegumento (figura 25b).

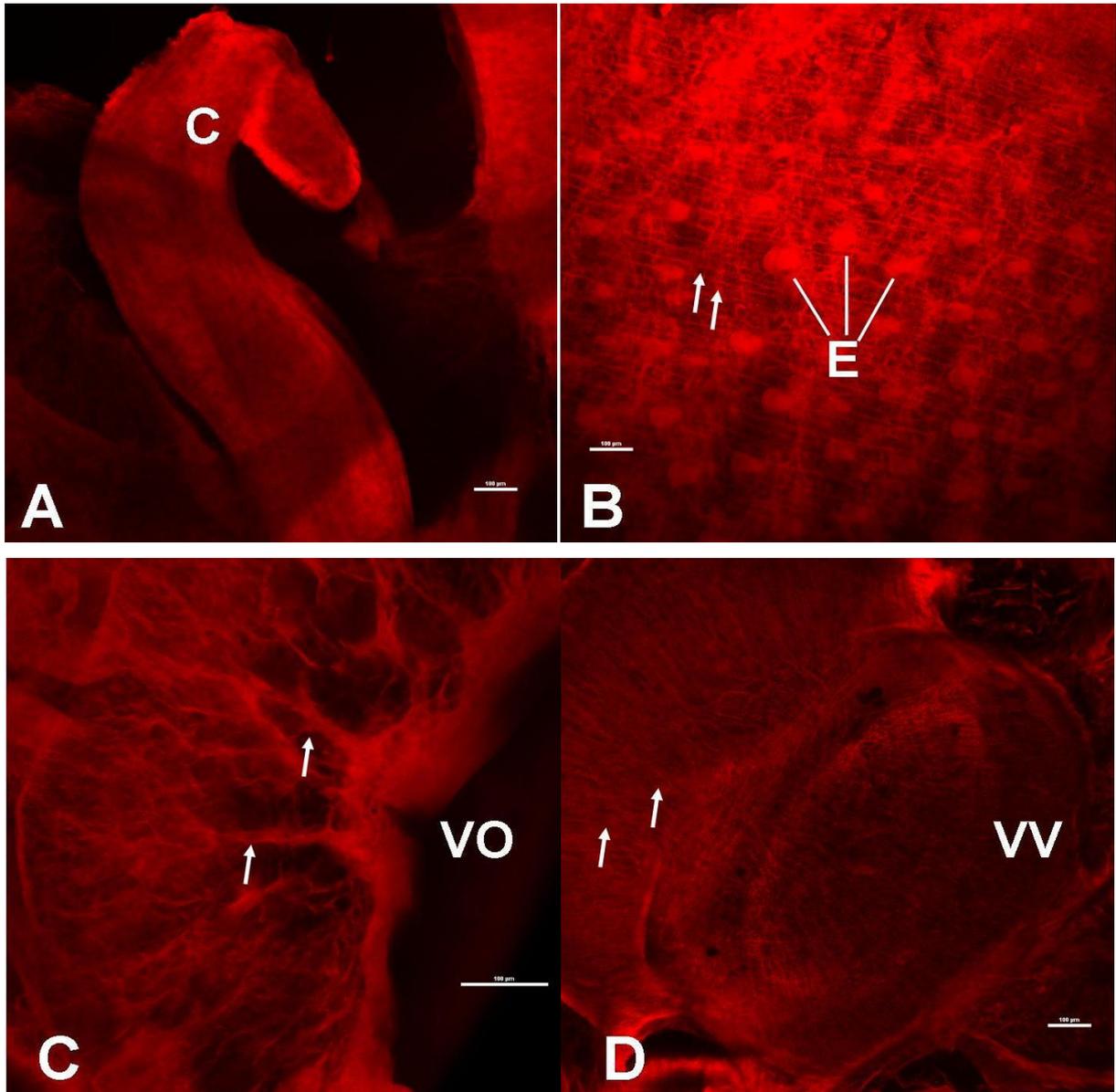


Figura 25: Estruturas morfológicas de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos do município de Lavras - MG visualizadas na microscopia confocal de varredura a laser. (A) C, cirro. (B) Detalhe do tegumento evidenciando os feixes musculares (**setas**) e os espinhos (E). (C) VO, ventosa oral; feixes musculares (**setas**); (D) VV, ventosa ventral; feixes musculares (**setas**).

## **5.5 MORFOMETRIA**

Para a morfometria de comprimento total e largura total, taxa de proporção comprimento total e largura total, foram analisados 88 espécimes no total, dos quais 41 eram provenientes de Cordeiro, 15 de Lavras, 18 de Catamarca e 14 de Salta (Tabela 1).

Parâmetros	Cordeiro	Lavras	Catamarca	Salta	Bolívia Valero et al., 2005	Galícia Mezo et al., 2013	Espanha Periago et al., 2006	Corsica Periago et al., 2006
Comprimento do Corpo (mm)	20.68 ± 2.68	34.47 ± 3.37	24.38 ± 2.23	14.92 ± 1.82	19.07 ± 3.45	16.25 ± 2.0	17.41 ± 0.23	20.45 ± 0.37
Largura do corpo (mm)	10.73 ± 1.86	12.33 ± 2.06	10.44 ± 1.29	8.78 ± 0.80	8.39 ± 1.51	9.71 ± 1.25	10.02 ± 0.17	10.71 ± 0.18
Razão CC/LC	1.96 ± 0.31	2.86 ± 0.48	2.37 ± 0.34	1.71 ± 0.22	2.30 ± 0.37	-----	1.74 ± 0.03	1.91 ± 0.03
Comprimento do Cone (mm)	3.14 ± 0.85	3.65 ± 0.60	2.61 ± 0.30	1.80 ± 0.23	2.11 ± 0.31	1.74 ± 0.25	2.02 ± 0.04	2.21 ± 0.03
Largura do Cone (mm)	2.50 ± 0.63	4.81 ± 0.35	3.43 ± 0.46	2.85 ± 0.32	2.76 ± 0.41	3.17 ± 0.32	3.20 ± 0.04	3.08 ± 0.04
Area da Ventosa Oral (mm)	0.39 ± 0.06	0.46 ± 0.16	0.41 ± 0.07	0.42 ± 0.04	0.37 ± 0.07	0.41 ± 0.12	0.41 ± 0.01	0.43 ± 0.01
Area da Ventosa Ventral (mm)	0.90 ± 0.37	1.20 ± 0.18	1.10 ± 0.36	1.20 ± 0.15	0.80 ± 0.15	0.98 ± 0.28	0.99 ± 0.02	0.93 ± 0.02
Distância VO – VV (mm)	1.44 ± 0.21	2.58 ± 0.20	2.14 ± 0.22	1.39 ± 0.18	-----	-----	1.41 ± 0.04	1.82 ± 0.03

Tabela 1: Dados morfométricos comparativos de espécimes de *Fasciola hepatica* provenientes de bovinos naturalmente infectados.

Todos os valores são mostrados como média ± desvio padrão.

O comprimento total (CT) dos espécimes de Lavras, as medidas variaram entre 30 e 40 mm, com valor médio de  $34,47 \pm 3,37$  mm. Já nos espécimes de Cordeiro variou entre 16 e 29 mm, com média de  $20,68 \pm 2,68$  mm. Nos espécimes da província de Catamarca, as medidas variaram entre 21 e 29 mm, com valor médio de  $24,38 \pm 2,23$  mm. Os espécimes da província de Salta apresentaram valores entre 12 e 18 mm, com média de  $14,92 \pm 1,82$  mm (Gráfico 1).

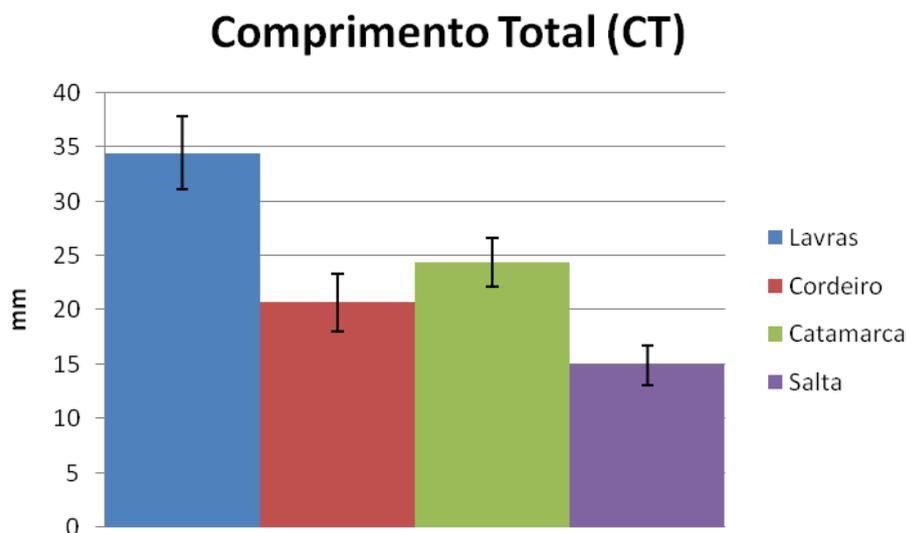


Gráfico 1: Análise morfométrica do comprimento total (CT) de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

A Largura total (LT) dos espécimes de Lavras variou entre 10 e 19 mm, com valor médio de  $12,33 \pm 2,06$  mm. Nos espécimes de Cordeiro variou entre 8 e 19 mm, com média de  $10,73 \pm 1,86$  mm. Já nos espécimes de Catamarca, as medidas variaram entre 9 e 13 mm, com média de  $10,44 \pm 1,29$  mm. Os espécimes de Salta apresentaram variação entre 12 e 18 mm, com média de  $8,78 \pm 0,80$  mm (Gráfico 2).

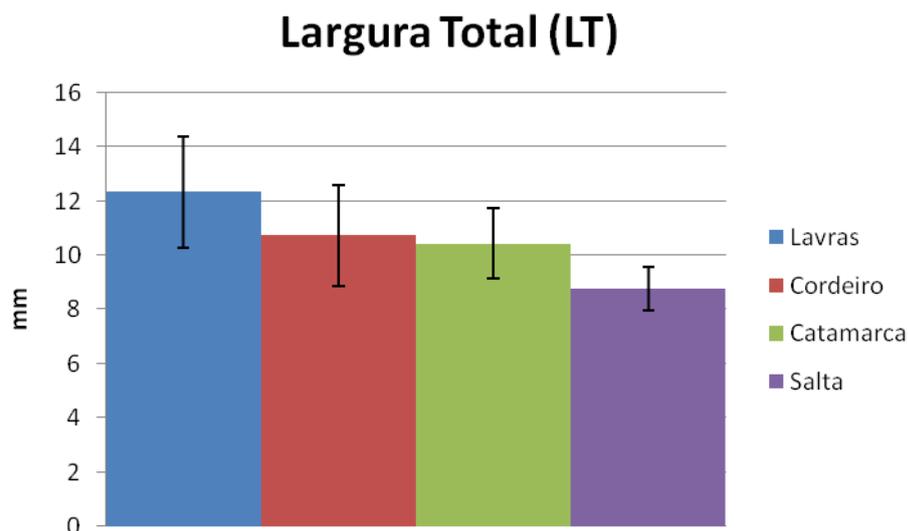


Gráfico 2: Análise morfométrica da largura total (LT) de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

A taxa de proporção entre comprimento total e largura total, nos espécimes de Lavras tais medidas variaram entre 1,58 e 3,50 mm, com média de  $2,86 \pm 0,48$  mm. Nos espécimes de Cordeiro variaram entre 1,64 e 2,33 mm, com média de  $1,96 \pm 0,31$  mm. Os espécimes de Catamarca apresentaram medidas variando de 1,75 a 2,89 mm, com valor médio de  $2,37 \pm 0,34$  mm. Já nos espécimes de Salta, as medidas variaram entre 1,20 e 2,0 mm, com valor médio de  $1,71 \pm 0,22$  mm (Gráfico 3).

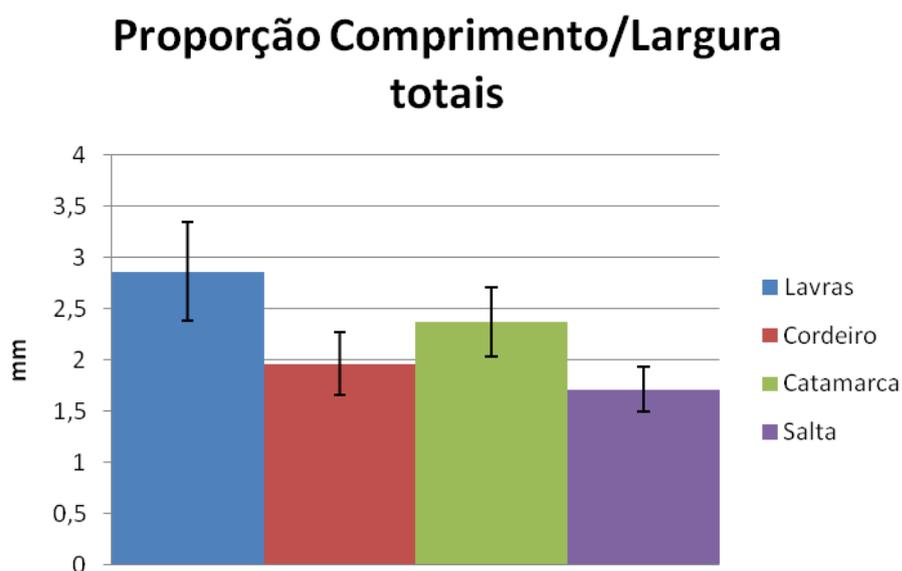


Gráfico 3: Análise morfométrica da razão comprimento total (CT)/ largura total (LT) de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

Para a morfometria do comprimento e largura do cone foram analisados 13 espécimes de Lavras, 32 de Cordeiro, 16 de Catamarca e 10 de Salta, totalizando 71 espécimes.

Os espécimes de Lavras apresentaram medidas variando entre 2,51 e 4,62 mm, com valor médio de  $3,65 \pm 0,60$  mm. Nos espécimes de Cordeiro variaram entre 1,86 e 4,44, com média de  $3,14 \pm 0,85$  mm. Nos espécimes de Catamarca, o comprimento do cone variou entre 2,08 e 3,14 mm, com média de  $2,61 \pm 0,30$  mm. Nos espécimes da província de Salta, as medidas variaram entre 1,56 e 2,32 mm, com média de  $1,80 \pm 0,23$  mm (Gráfico 4).

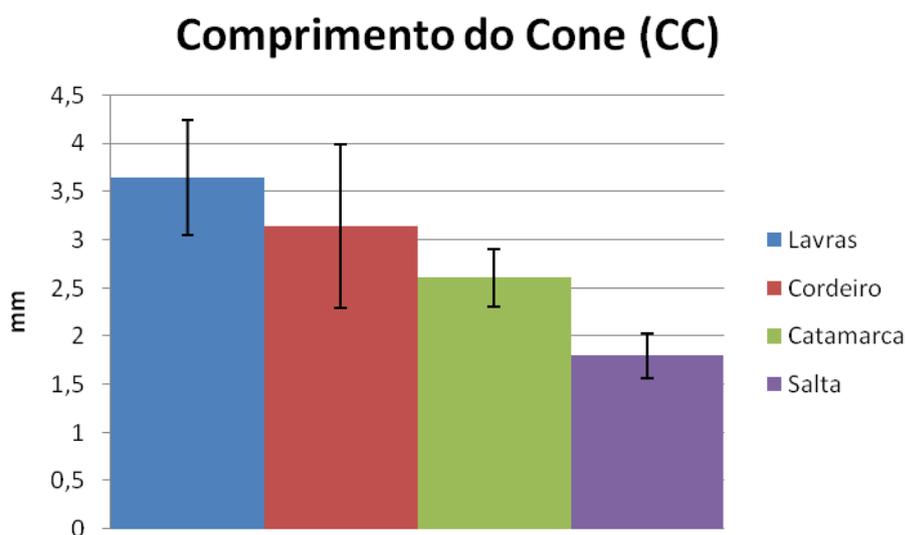


Gráfico 4: Análise morfométrica do comprimento do cone cefálico (CC) de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

Nos espécimes de Lavras, a largura do cone apresentou valores variando entre 4,51 e 5,52 mm, com valor médio de  $4,81 \pm 0,35$  mm. Nos espécimes de Cordeiro as medidas variaram entre 1,97 e 3,72 mm, com média de  $2,50 \pm 0,63$  mm. Os espécimes de Catamarca apresentaram a largura do cone variando entre 2,48 e 4,10 mm, com média de  $3,43 \pm 0,46$  mm. Já os espécimes de Salta apresentaram medidas variando entre 2,65 e 3,15 mm, com média de  $2,85 \pm 0,32$  mm (Gráfico 5).

## Largura do Cone (LC)

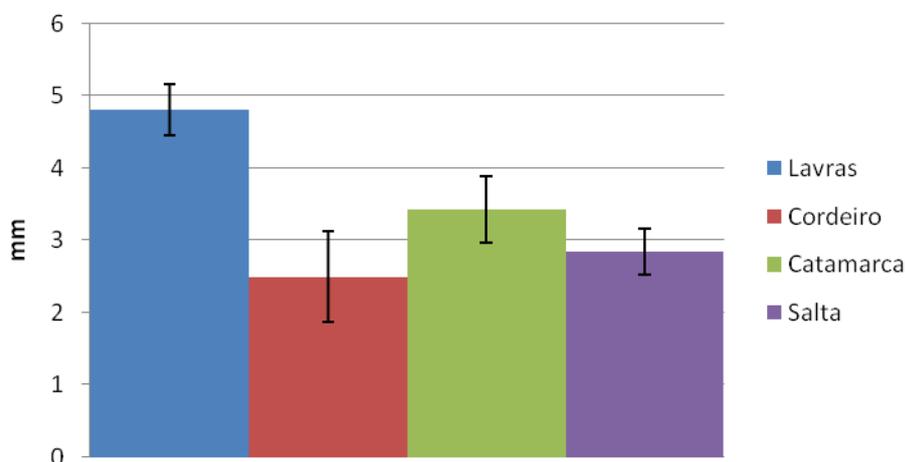


Gráfico 5: Análise morfométrica da largura do cone cefálico (LC) de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

A área da ventosa oral foi analisada em 64 espécimes, sendo 5 de Lavras, 33 de Cordeiro, 17 de Catamarca, 9 de Salta. Nos espécimes de Lavras, a área da ventosa oral variou entre 0,22 e 0,5 mm, com média de  $0,46 \pm 0,16$  mm. Nos espécimes de Cordeiro, a área variou entre 0,25 e 0,52 mm, com valor médio de  $0,39 \pm 0,06$  mm. Nos espécimes de Catamarca, a área variou entre 0,33 e 0,57 mm, com média de  $0,41 \pm 0,07$  mm. Já nos espécimes de Salta, os valores da área variaram entre 0,34 e 0,49, com média de  $0,42 \pm 0,04$  mm (Gráfico 6).

## Área Ventosa Oral (VO)

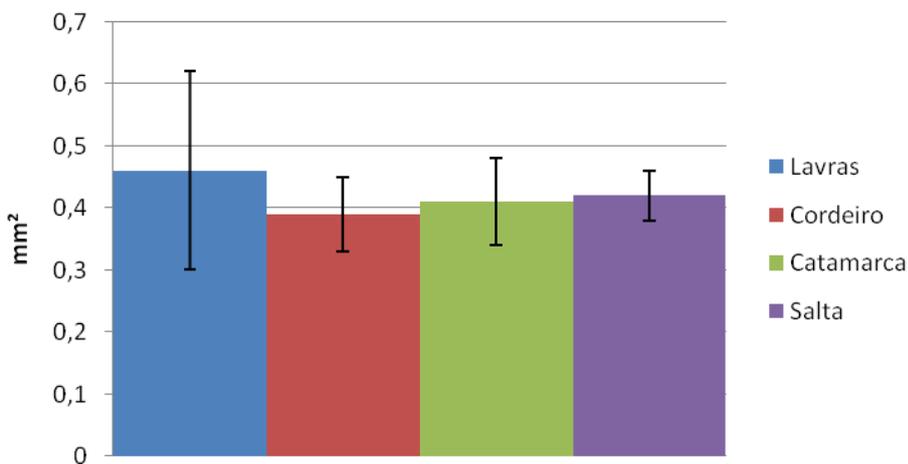


Gráfico 6: Análise morfométrica da área da ventosa oral (VO) de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

A área da ventosa ventral foi analisada em 7 espécimes de Lavras, 12 de Cordeiro, 15 de Catamarca e 9 de Salta, totalizando 43 espécimes. Nos espécimes de Lavras, as medidas variaram entre 0,91 e 1,42 mm, com média de  $1,20 \pm 0,18$  mm. Nos espécimes de Cordeiro, os valores variaram entre 0,15 e 1,33 mm, com média de  $0,90 \pm 0,37$  mm. Já nos espécimes de Catamarca, as medidas variaram entre 0,19 e 1,58 mm, com média de  $1,10 \pm 0,36$  mm. Nos espécimes de Salta, as medidas variaram entre 0,98 e 1,42 mm, com média de  $1,20 \pm 0,15$  mm (Gráfico 7).

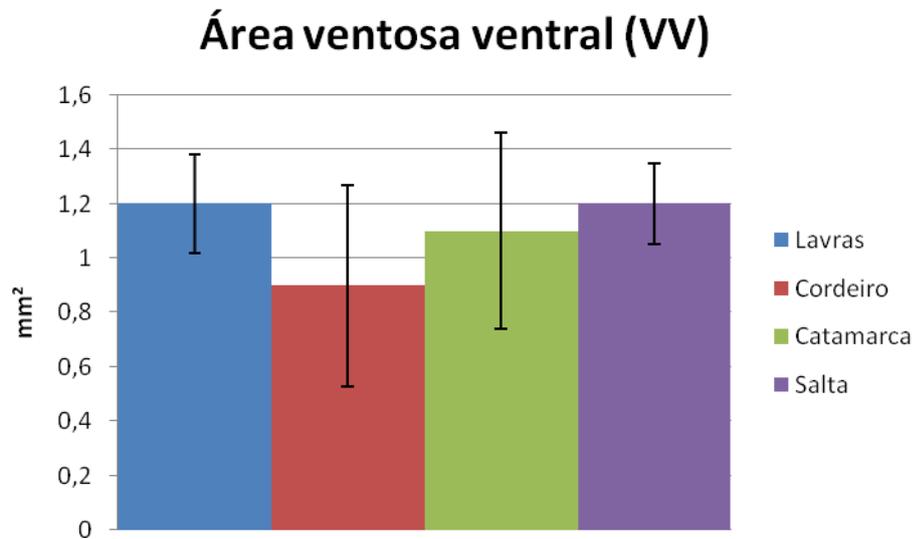


Gráfico 7: Análise morfométrica da área da ventosa ventral (VV) de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

A distância entre as ventosas também foi analisada. Cinco espécimes de Lavras, 13 de Cordeiro, 16 de Catamarca e 12 de Salta, totalizando 46 espécimes. Nos espécimes de Lavras, a distância entre as ventosas variou entre 2,33 e 2,84 mm, com valor médio de  $2,59 \pm 0,20$  mm. Nos espécimes de Cordeiro, os valores variaram entre 1,14 e 1,86 mm, com média de  $1,44 \pm 0,21$  mm. Já nos espécimes de Catamarca as medidas variaram entre 1,86 e 2,46 mm, com média de  $2,14 \pm 0,22$  mm. Nos espécimes de Salta os valores da distância entre as ventosas variaram entre 1,06 e 1,70 mm, com valor médio de  $1,39 \pm 0,18$  mm (Gráfico 8).

### Distância entre ventosas (VO-VV)

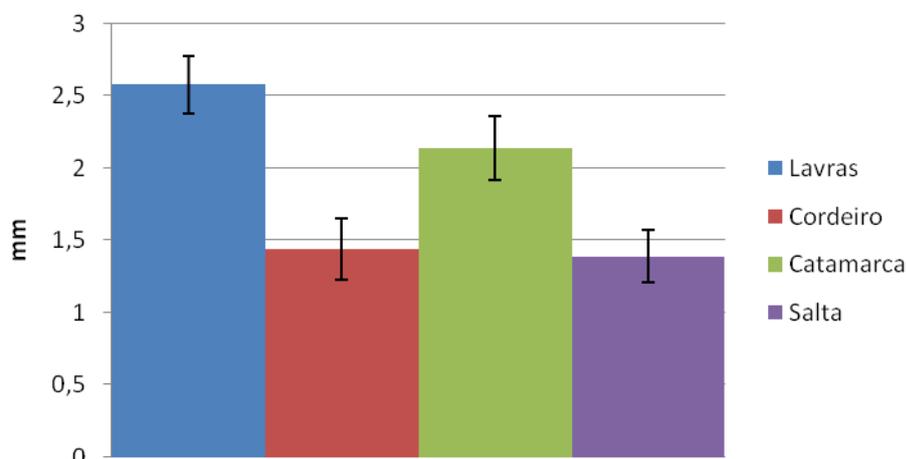


Gráfico 8: Análise morfométrica da distância entre as ventosas (VO - VV) de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

Foram analisados, também, 56 ovos presentes no útero dos espécimes, sendo nove de espécimes provenientes de Lavras, 30 de Cordeiro e 17 de Catamarca. Não foi possível analisar os ovos nos espécimes de Salta, por dificuldade de visualização dos mesmos.

O comprimento dos ovos presentes no útero dos espécimes de Lavras variava entre 106,99 e 131,66  $\mu\text{m}$ , com média de  $121,08 \pm 7,68 \mu\text{m}$ . Nos espécimes provenientes de Cordeiro variavam entre 67,78 e 115,38  $\mu\text{m}$ , com média de  $97,26 \pm 15,12 \mu\text{m}$ . Já nos espécimes provenientes de Catamarca as medidas variaram entre 71,51 e 131,02  $\mu\text{m}$ , com média de  $98,94 \pm 15,56 \mu\text{m}$  (Gráfico 9).

### Comprimento dos ovos (CO)

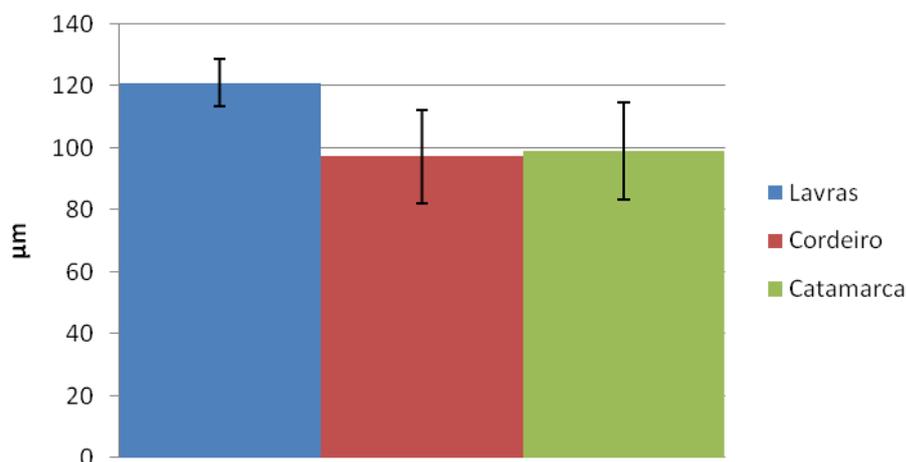


Gráfico 9: Análise morfométrica do comprimento dos ovos (CO) presentes no útero de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

A largura dos ovos presentes no útero dos espécimes de Lavras apresentou medidas que variaram entre 61,14 e 69,97  $\mu\text{m}$ , com média de  $65,54 \pm 3,15 \mu\text{m}$ . Nos espécimes de Cordeiro, as medidas variaram entre 42,43 e 71,95  $\mu\text{m}$ , com média de  $52,46 \pm 7,43 \mu\text{m}$ . Já nos espécimes de Catamarca, as medidas dos ovos variaram entre 48,04 e 68,44  $\mu\text{m}$ , com média de  $62,09 \pm 5,17 \mu\text{m}$  (Gráfico 10).

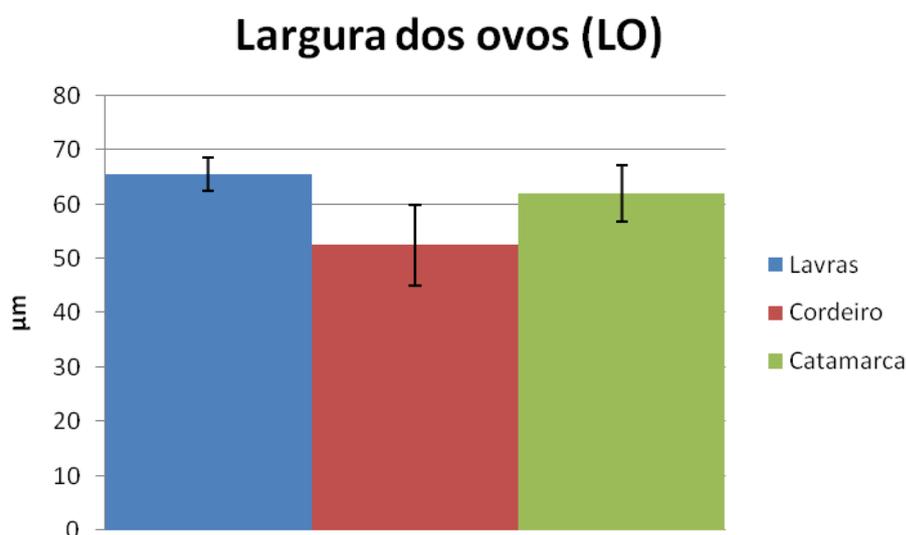


Gráfico 10: Análise morfométrica da largura dos ovos (LO) presentes no útero de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

A área dos ovos nos úteros dos espécimes também foi calculada. Nos espécimes de Lavras, a média da área foi de  $6229.5 \pm 500.68 \mu\text{m}^2$ . Nos espécimes de Cordeiro, a média foi de  $4033.4 \pm 968.24 \mu\text{m}^2$ . Já nos espécimes de Catamarca, a média foi de  $4827.7 \pm 882.4 \mu\text{m}^2$  (Gráfico 11).

## Área dos ovos

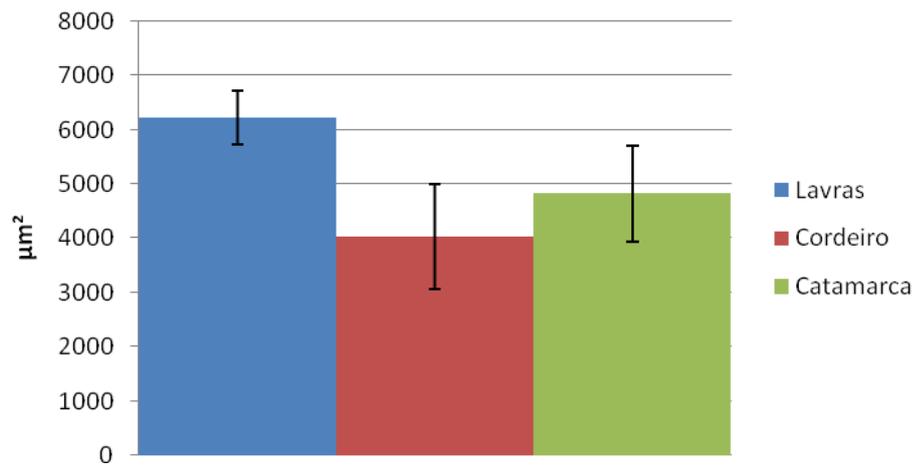


Gráfico 11: Análise morfométrica da área dos ovos (AO) presentes no útero de espécimes de *Fasciola hepatica* procedentes de bovinos, por meio de análise digital.

## 6. DISCUSSÃO

Estudos morfológicos de trematódeos têm como objetivo caracterizar estruturas de vermes adultos e ovos. Para isso, alguns autores utilizam microscopia de campo claro, microscopia de varredura a laser confocal e microscopia eletrônica de varredura (Abrous et al., 1998; Mair et al., 1998a; Mair et al., 1998b; Valero et al., 2001; Mc Conville et al., 2008; Hanna et al., 2012). A microscopia de campo claro se mostrou muito eficaz para a análise das estruturas dos vermes adultos e ovos de *Fasciola hepatica*. Esta técnica tem sido muito utilizada ao longo dos últimos anos no estudo destes helmintos (Valero et al., 2005; Periago et al., 2008; Valero et al., 2012).

As características morfológicas, quando visualizadas na microscopia de campo claro, se apresentaram semelhantes nas localidades de Cordeiro, Salta e Catamarca. Tais características são confirmadas pela literatura (Araújo et al., 1995; Marques, 2002; Oliveira, 2008). Nos espécimes de Lavras não foi possível observar a presença de espinhos, e as demais estruturas se apresentaram conforme já descrito. Os espinhos, além de estarem relacionados à patogenicidade do parasito, possuem função na nutrição deste, de forma indireta, causando lesões no epitélio dos órgãos acometidos, o que permite o acesso mais fácil às substâncias necessária para a sua sobrevivência (Oliveira, 2008).

A microscopia eletrônica de varredura é comumente utilizada para estudos da ação de fármacos no tegumento de helmintos (Toner et al., 2008; Meaney et al., 2006; O'Neill et al., 2009). Neste estudo, esta técnica foi complementar à microscopia de campo claro, tornando possível a visualização do tegumento do parasito.

As estruturas se apresentaram com sutis diferenças, quando comparadas de acordo com a localidade de origem do espécime. Porém, não foi observada nenhuma anormalidade nos espécimes. Com esta técnica foi possível verificar que os espécimes provenientes de Lavras possuem espinhos, porém foi percebido que o tamanho destes estava menor do que os das outras localidades.

Marques (2002), ao descrever a morfologia do parasito citou a existência de papilas sensoriais no tegumento, que teriam função quimio/mecanorreceptoras. Estas estruturas não foram visualizadas em nenhum dos espécimes através da microscopia de campo claro,

A microscopia confocal de varredura a laser é amplamente utilizada para o estudo das estruturas e da organização muscular de helmintos (Mair et al., 1998a; Mair et al.,

1998b; Machado-Silva et al., 1998; Kumar et al., 2003). Tal técnica tem acrescentado inúmeras informações sobre a fisiologia de parasitos.

De acordo com Mair et al. (1998b) a musculatura somática forma o sistema muscular bruto dos platelmintos e é composta por grupos diferentes de fibras. A parede do corpo é formada por feixes longitudinais e circulares bem desenvolvidos, que são organizados em “rede”, com fibras diagonais abaixo. Esta organização muscular foi notada nos espécimes de todas as localidades deste estudo.

Feixes musculares organizados em “rede” são também encontrados em outros helmintos, o que indica que estes feixes servem tanto para a locomoção quanto para fornecer o formato do corpo de helmintos (Mair et al., 1998b; Halton et al., 1998).

Mair et al. (1998b) salientou que as ventosas dispõem de três tipos de organização das fibras musculares: longitudinal, circular e radial. O autor relata que contrações nos feixes longitudinais servem para abrir a ventosa e achatá-la contra o substrato do hospedeiro, enquanto os feixes radiais fecham a ventosa em formato de “copo” e os feixes circulares criam uma força de sucção, segurando o tecido do hospedeiro à ventosa. As fibras longitudinais nas ventosas foram visualizadas em todos os espécimes.

Numerosas fibras musculares longitudinais e circulares altamente organizadas foram visualizadas no cirro dos espécimes de Catamarca, que estavam exteriorizados. Em um estudo publicado em 1998, uma organização similar foi encontrada por Mair (Mair et al., 1998b).

Os dados acerca da musculatura de helmintos, relatando sua importância na locomoção, fixação, atividades reprodutivas e digestivas de helmintos são imprescindíveis para a criação de novos fármacos (Thompson et al., 1996).

Estudos anteriores realizaram morfometria de espécimes adultos e ovos de *Fasciola hepatica* oriundos de países da América, Ásia, África e Europa, como Peru, Bolívia, Egito, Vietnã, EUA, Espanha, Filipinas e França (Kimura et al., 1984; Valero et al., 2001; Valero et al., 2009). Estudos com espécimes oriundos de estados brasileiros ainda não foram realizados, tampouco foram feitas comparações dos mesmos com espécimes obtidos em outros países.

Quando analisado o comprimento do corpo, houveram diferenças significantes entre as quatro localidades. Os espécimes de Cordeiro, Catamarca e Lavras se apresentaram maiores dos que os relatados em trabalhos anteriores. Já os espécimes de Salta apresentaram as menores medidas, quando comparados com os espécimes deste

estudo e da Bolívia (Valero et al., 2005), Galícia (Mezo et al., 2013), Espanha e Corsica (Periago et al., 2006).

A diferença nas medidas da largura do corpo foi maior quando comparamos os espécimes de Lavras com Cordeiro, Catamarca e Salta. Quando comparamos os espécimes de Salta com as demais localidades foram notadas, também, diferenças nas medidas. Apenas quando os espécimes de Cordeiro e Catamarca foram comparados, essa significância não ocorreu. Os espécimes de Lavras apresentaram-se bem mais largos do que os espécimes relatados na literatura (Mezo et al., 2003; Valero et al., 2005; Periago et al., 2006).

As medidas da razão comprimento/largura do corpo apresentaram diferenças significativas entre os espécimes. Apenas quando comparamos os espécimes de Cordeiro e Salta, não houve significância. Isto indica que, embora as medidas das duas localidades sejam diferentes, quando é realizado o cálculo comprimento/largura do corpo as duas localidades são proporcionais. As medidas de todas as localidades deste estudo, embora um pouco maiores, foram próximas do que é relatado na literatura (Mezo et al., 2003; Valero et al., 2005; Periago et al., 2006).

As medidas do comprimento do cone foram extremamente diferentes quando comparamos as localidades entre si. Apenas na comparação Cordeiro x Lavras, não apresentaram significância. Todas as medidas resultantes deste estudo foram maiores do que o que as medidas relatadas na Bolívia (Valero et al., 2005), Galícia (Mezo et al., 2003), Espanha e Corsica (Periago et al., 2006).

Na largura do cone, os espécimes de Lavras apresentaram-se bastante diferentes das demais localidades. Quando comparados Cordeiro x Salta, não houve diferença significativa. Apenas os espécimes provenientes de Lavras apresentaram discrepância em relação à literatura (Mezo et al., 2003; Valero et al., 2005; Periago et al., 2006).

As áreas da ventosa oral das quatro localidades de estudo não apresentaram diferenças entre si e se aproximaram, também, do que foi relatado em outros estudos. A ventosa ventral também não apresentou grande diferença entre as localidades de estudo. Apenas quando comparadas com as medidas dos espécimes de Bolívia (Valero et al., 2005), Galícia (Mezo et al., 2003), Espanha e Corsica (Periago et al., 2006), os espécimes de Lavras, Cordeiro, Catamarca e Salta apresentaram ventosa ventral de maior tamanho.

A distância entre as ventosas oral e ventral foi também analisada. As medidas foram extremamente significantes na comparação entre as localidades. Apenas Cordeiro x Salta não apresentou significância. Os espécimes de Salta e Lavras apresentaram

menores e maiores medidas, respectivamente, quando comparadas com a literatura existente (Mezo et al., 2003; Valero et al., 2005; Periago et al., 2006)..

As características analisadas nos ovos apresentaram diferenças com relação aos resultados relatados em trabalhos anteriores na Bolívia (Valero et al., 2005) e no Vietnã, na Geórgia e no Egito (Valero et al., 2009). O comprimento e a largura se mostraram menores, quando comparados aos trabalhos acima citados. Essas diferenças podem estar relacionadas ao fato de as análises terem sido realizadas em ovos presentes no útero dos espécimes, diferente dos demais autores, que utilizaram os ovos nas fezes.

## CONCLUSÕES

- Foram encontradas diferenças na morfologia dos espécimes analisados, considerando a diferença na quantidade e distribuição de espinhos;
- A utilização integrada de diversas técnicas microscópicas para o estudo de *Fasciola hepatica* são necessárias para um maior entendimento da morfologia do parasito;
- Foram encontradas diferenças morfométricas nos espécimes em todas as estruturas analisadas;
- Foram encontradas diferenças morfométricas nos ovos presentes no útero dos espécimes quando comparados com a literatura, podendo estar relacionadas ao fato de os mesmos terem passado por processo de fixação diferente do que é realizado por outros autores;
- As diferenças entre as características dos espécimes de *Fasciola hepatica* podem estar relacionadas às características dos locais de origem, tendo em vista que todos os espécimes são de bovinos;
- São necessários mais estudos integrados, incluindo a Biologia Molecular, para ampliar o nosso entendimento acerca de *Fasciola hepatica*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrous M, Comes AM, Gasnier N, Rondelaud D, Dreyfuss G, Chauvin A, Ménard A, Agoulon A, Cabaret J. Morphological variability in *Fasciola hepatica* eggs in ruminants, rodents and lagomorphs. *Journal of Helminthology*. 1998; 72(4): 313-317.

Alatoon A, Cavuoti D, Southern P, gander R. *Fasciola hepatica* infection in the United States. *LabMedicine Journal*. 2008; 39: 425-428.

Alvarez-Sanchez MA, Mainar-Jaime RC, Peres-Garcia J, Rojo-Vasquez FA. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*. 2006; 159: 424-425.

Alves DP. Distribuição e fatores associados à infecção por *Fasciola hepatica* em bovinos em municípios do sul do estado do Espírito Santo no período de 2008/2009. [Dissertação]. Porto Alegre: UFES; 2010.

Andrews SJ. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP. Fasciolosis. Ontario: CABI Publishing, 1999; 1 (1): 1-29.

Anon. Resistance to fluke drug found on Sligo farm. *Irish Farmers Journal*. 1995 Mar;2.

Apt W, Aguilera X, Veja AH, Zulantay I, Apt P, González V, Retamal C, Rodriguez J, Sandoval JP. Prevalencia de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres, en tres provincias de Chile. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 1993; 11: 405-414.

Araújo JLB, Garcia CA, Linhares GFC. Ocorrência de *Fasciola hepatica*, (Linnaeus, 1758) (Trematoda, Fasciolidae), no Estado de Goiás. *Revista de Patologia Tropical*. 1995; 24(2): 283-289.

Bacigalupo J, Bengolea J, Velazco Suarez G. Algunas consideraciones biológicas sobre distomatosis por *Fasciola hepatica* em el hombre. A propósito de dos

casos encontrados em La Argentina. Archivos de La Sociedade de Biologia de Montevideo. 1930; 5: 1211.

Baruch WA. Fasciolíase. In: Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. Atheneu; 1999: 222-227.

Bengolea J, Bacigalupo J, Velazco Suarez G. Distomatosis por *Fasciola hepatica*. Archivos Argentinos de Enfermedades Del Aparato Digestivo y de La Nutrición. 1927; 3(1): 151

Bennema SC, Scholte RGC, Molento MB, Medeiros C, Carvalho OS. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: Data availability and spatial distribution. 2014; 56(1): 35-41.

Bernardo CD, Carneiro MB, Avelar BR, Donatele DM, Martins IV, Pereira MJ. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2011; 20(1): 49-53.

Borchert A. Parasitologia Veterinária. Espanha: Acribia. p 45-47. 1981.

Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Orelli M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. Veterinary Record. 1983 Oct;113(14):315-7.

Chilton NB. The use of nuclear ribosomal DNA markers for the identification of bursate nematodes (order strongylida) and for the diagnosis of infections. Animal Health Research Reviews. 2004; 5: 173 – 187.

Corrêa O. Incidência de hidatidose, fasciolose, estefanurose e cisticercose nos rebanhos riograndenses. Revista de Faculdade de Agronomia e Veterinária. 1965; 7(2): 137-146.

Cunha FOV, Marques SMT, Mattos MJT. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. *Parasitología Latinoamericana*. 2007; 62: 188 – 191.

Dawes B. *The Trematoda*. Cambridge University Press. 1946.

Dreyfuss G, Correa AC, Djuikwo-Teukeng FF, Novobilsky A, Höglund J, Pankrác J, Kasný, Vignoles P, Hurtrez-Boussès S, Pointier JP, Rondelaud D. Differences in the compatibility of infection between the liver flukes *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in a Colombian population of the snail *Galba* sp. *Journal of Helminthology*. 2014; in press (doi: 10.1017/S0022149X14000509).

Durant-Savoyat M. El saguipé. Epizootía causada por el Saguipé vulg. Duva o *Fasciola* de Linnéo. *Anais da Sociedade Rural Argentina* 1867;

El-Kouba, Motta M, Nunes A. Aspectos gerais da fasciolose e das endoparasitoses em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* - linnaeus, 1766) e ratões de banhado (*Myocastor coypus* - Molina, 1782) residentes em três parques do Estado do Paraná. [Dissertação]. Curitiba: UFPR, 2005.

Espinoza JR, Terashima A, Herrera-Velit P, Marcos LA. Human and animal fascioliasis in Peru: impact in the economy of endemic zones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2010; 27(4):604-12.

Esteban JG, Bargues MD, Mas-Coma. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Research and reviews in parasitology*. 1998; 58(1):13-42.

Foreyt WJ. *Parasitologia veterinária: manual de referência*. Editora Roca. 5ª edição; 2005. São Paulo.

França I. *Fasciola hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba. *Boletim do Campo*. 1969; 230: 21-22.

Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst GD. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*. 2002; 18:4541-4550.

Girão, ES & Ueno H. Técnica dos quatro tamises. In: Ueno H, Gonçalves PC. Manual para o diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 3ª edição. Porto Alegre: JICA, 1994. p. 62.

Gomes FF, Oliveira FCR, Pile EA, Lopes CWG. Establishment of focus of hepatic fasciolosis at property in the Municipality of Campos of Goytacazes in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2002; 11: 53-56.

Graczyk TK, Fried B. In: JP Dalton. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host: CAB International, Oxon; 1999.31–46.

Greenway D. Distomatosis humana por *Fasciola hepatica* en la Argentina. Primer diagnóstico coproscópico. *Prensa Médica Argentina*. 1924; 1: 369.

Grove DI. A history of human helminthology. CAB International, Oxon; 1990.

Gulsen MT, Savas MC, Koruk M, Kadayifci A, Demirci F. Fascioliasis: a report of five cases presenting with common bile duct obstruction. *Netherlands Journal of Medicine*. 2006; 64(1):17-9.

Halton DW, Maule AG, Mair GR, Shaw C. Monogenean neuromusculature: some structural and functional correlates. *International Journal for Parasitology*. 1998; 28: 1609-1623

Hanna RE, Moffett D, Brennan GP, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: a light and electron microscope study of sustentacular tissue and heterophagy in the testis. *Veterinary Parasitology*. 2012 Jun 8;187:168-182.

Hatschbach PI. A *Fasciola hepatica* e sua história. *A hora veterinária* 1995; 1:10-12.

Hurtrez-Boussès S, Meunier C, Durand P, Renaud F. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection*. 2001. 3: 841-849.

Hussein ANA, Hassan IM, Khalifa RMA. Description of eggs and larval stages of *Fasciola*, light and scanning electron microscopic studies. *Research Journal of Parasitology*. 2010; 5: 1-12.

Keiser J, Morson G. *Fasciola hepatica*: Tegumental alterations in adult flukes following in vitro and in vivo administration of artesunate and artemether. *Experimental Parasitology*. 2008 Aug;118: 228-237.

Kimura S, Shimizu A, Kawano J. Morphological observation on liver fluke detected from naturally infected carabaos in the Philippines. *Science Reports of Faculty of Agriculture - Kobe University*. 1984;16:353-357.

Kleiman F, Pietrokovsky S, Gil S, Wisnivesky-Colli C. Comparação de dois métodos coprológicos para diagnóstico da fasciolose. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*. 2005; 57 (2): 181 – 185.

Kumar D, McGeown JG, Reynoso-Ducoing O, Ambrosio JR, Fairweather I. Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 2003;127: 457-473.

Langeron M. *Précis de Microscopie*. 1949. 7ed. 1430 pp.

Li MW, Lin RQ, Song HQ, Sani RA, Wu XY, Zhu XQ. Electrophoretic analysis of sequence variability in three mitochondrial DNA regions for Ascaridoid parasites of human and animal health significance. *Electrophoresis*. 2008; 29:2912-2917.

Lutz A. Sobre a ocorrência de *Fasciola hepatica*, no Estado do Rio de Janeiro. *Boletim do Instituto Oswaldo Cruz*. 1921;1(1): 9-13.

Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1998. 93 (1): 303-307.

Mair GR, Maule AG, Shaw C, Halton DW. Muscling is on parasitic flatworms. Parasitology Today. 1998. 14 (2): 73-76.

Mair GR, Maule AG, Shaw C, Johnston CF, Halton DW. Gross anatomy of the muscle systems os *Fasciola hepatica* as visualized by phalloidin-fluorescence and confocal microscopy. Parasitology. 1998b; 117: 75-82.

Marcilla A, Bargues MD, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Molecular and Cellular Probes. 2002;16:327-333.

Marques SMT. Gromerulonefrite na fasciolose bovina e bubalina. [Tese]. Porto Alegre: UFRS; 2002.

Martins IVF, Bernardo CC, Avelar BR, Araújo IBBA, Donatele DM, Nunes LC. Sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de sedimentação (Foreyt, 2005) para o diagnóstico de *Fasciola hepatica*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2008; 17 (1): 110-112.

Mas-Coma, S. Human fascioliasis. In: Cotruvo JA, Dufour A, Rees G, Bartram J, Carr R, Cliver DO, Craun GF, Fayer R, Gannon VPJ. World Health Organization–waterborne zoonoses, identification, causes and control. London: IWA Publishing, Alliance House; 2004.305–322.

Mas-Coma S, Bargues MD. Human liver flukes: a review. Research and Reviews in Parasitology. 1997; 57:145–218.

Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. International Journal for Parasitology. 2005 Oct; 35:1255-1278.

McConville M, Brennan G, Flanagan A, Edgar HWJ, McCoy M, Castillo R, Hernandez-Campos A, Fairweather I. Surface and internal tegumental changes in juvenile *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Veterinary Parasitology*. 2008; 153(1-2): 52-64.

Meaney M, Allister J, McKinstry B, McLaughlin K, Brennan GP, Forbes AB, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: morphological effects of a combination of triclabendazole and clorsulon against mature fluke. *Parasitology Research*. 2006; 99: 609-621.

Medeiros C, Scholte RGC, D'Ávilla S, Caldeira RL, Carvalho OS. Spatial distribution of Lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2014; 56(3): 235-252.

Mendes EA. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). [Dissertação]. Minas Gerais: UFMG; 2006.

Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Manga-González MY, Peixoto R, Mas-Coma S, Valero MA. The wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) as secondary reservoir of *Fasciola hepatica* in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*. 2013; 198 (3-4): 274-283.

Mitchell GB, Maris L, Bonniwell MA. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary Record*. 1998;143:399.

Moll L, Gaasenbeek CPH, Vellema P, Borgsteede FHM. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*. 2000;91:153-158.

Muniz-Pereira LC, Arruda VS, Pinto RM. Confirmação da sinonímia de *Gynaecotyla jaegerskioeldi* (Travassos) (Digenea, Microphallidae) com *Gynaecotyla adunca* (Linton) (Digenea, Gynaecotylinae). *Revista Brasileira de Zoologia*. 2004 Dec;21(4):801-804.

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

Oliveira EL. Prevalência e fatores associados à distribuição da *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em bovinos dos municípios de Careacú e Itajubá, região da bacia do Rio Sapucaí – Minas Gerais. [Dissertação]. Belo Horizonte: UFMG; 2008.

Oliveira AA, Nascimento AS, Monteiro TAS, Arcos PRS, Albuquerque BC, Aguiar GPR, Garcia FTP, Vitor JCL, Silva AG, Ataíde NCP, Pereira R, Lima PC. Detecção de casos humanos de *Fasciola hepatica* no estado do Amazonas. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*. 2005;05:01-05.

Oliveira AA, Nascimento AS, Santos TAM, Carmo GMI, Dimech CPN, Alves RMS, Malaspina FG, Garcia MHO, Santos DA, Aguiar GRP, Albuquerque BC, Carmo EH. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no Município de Canutama, Estado do Amazonas, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2007;16:251-259.

O'Neill JF, Johnston RC, Halferty L, Brennan GP, Keiser J, Fairweather I. Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: morphological changes in the tegument and gut following in vivo treatment with artemether in the rat model. *Journal of Helminthology*. 2009 Jun; 83(2):151-63.

Overend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to Triclabendazole. *Australian Veterinary Journal*. 1995; 72 (7) 275-6.

Panaccio M, Trudgett A. Molecular biology. In: Dalton, JP. Fasciolosis. Wallingford: Oxon CAB International Publishing;1999.449–464.

Paula RC. Influência da proteína inflamatória de macrófagos CCL3 em camundongos C57B1/6J infectados com *Fasciola hepatica*. [Dissertação]. Belo Horizonte: UFMG; 2007.

Periago MV, Valero MA, El Sayed M, Ashrafi K, El Wakeel A, Mohamed MY, Desquesnes M, Curtale F, Mas-Coma S. First phenotypic description of *Fasciola*

*hepatica/Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. Infection, Genetics and Evolution. 2008; 8:51-58.

Periago MV, Valero MA, Panova M, Mas-Coma S. Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). Parasitology Research. 2006 Mar;99:368-378.

Pile E, Gazeta G, Santos JAA, Coelho B e Serra-Freire NM. Ocorrência de fasciolíase humana no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. Revista de Saúde Pública. 2000 Aug;34(4):413-414.

Pile E, Santos JAA, Pastorello T, Vasconcellos M. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2001; 38 (1): 42-43.

Queiroz VS, Luz E, Leite LC, Círio SM. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): Estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúvas do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). Acta Biológica Paranaense. 2002;31(1-4):99-111.

Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. Editora Guanabara Koogan, 9ª edição, 2000.

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

Ribeiro PA. Incidência das causas de rejeição de bovinos abatidos no Brasil Central – prejuízos causados pelas mesmas nos anos de 1946-7. Revista da Faculdade de Medicina Veterinária, São Paulo. 1949; 4 (1): 167-183.

Roffo AH. Distomatosis humana, primer caso observado en el país. Imprenta y Editora Coni Hermanos.1913; 1-38.

Rondelaud, D, Dreyfuss, G. *Fasciola hepatica*: the influence of the definitive host on the characteristics of infection on the snail *Lymnaea truncatula*. Parasite. 1995;12:275-280.

Rushton B. Ovine fascioliasis following reinfection. Research in Veterinary Science. 1977; 22: 133-134.

Sakru N, Korkmaz M, Demirci M, Kuman A, Ok UZ. *Fasciola hepatica* infection in echinococcosis suspected cases. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2011;35:77-80.

Serra-Freire NM. Fasciolose hepatica no Brasil: Análise retrospectiva e perspectiva. Caderno técnico científico da escola de medicina veterinária. 1999; 1 (1): 9-70.

Serra-Freire NM & Nuernberg S. Geopolitical dispersion of the occurrence of *Fasciola hepatica* in the State of Santa Catarina, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1992; 87( suppl.1): 263-269.

Sinclair KB. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. British Veterinary Journal. 1962; 118: 37-53.

Silva Santos IC, Scaini CJ, Rodrigues IAF. *Myocastor coypus* (Rodentia: Capromyidae) como reservatório silvestre de *Fasciola hepática* (Lineu, 1758). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 1992; 1: 27-30.

Stunkard HW. Intraspecific variation in parasitic flatworms. Systematic Zoology. 1957; 6: 7-18.

Thomas I, Coles GC, Duffus K. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in southwest Wales. Veterinary Record. 2000;146 (7):200.

Thompson DP, Klein RD, Geary TC. Prospects for rational approaches to antihelminthic discovery. Parasitology. 1996; 113: 217-238

Toner E, Brennan GP, Wells K, McGeown JG, Fairweather I. Physiological and morphological effects of genistein against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 2008; 135:1189-1203.

Ueno H, Gutierrez VC. Manual para Diagnósticos das Helmintoses de Ruminantes. 4ª. Tóquio (Japan): Japan International Cooperation Agency; 1994.

Ueno H, Gutierrez VC, de Mattos MJ, Müller G. Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 1982(Nov); 11(2-3):185-91.

Urquhart GM, Dunn AM, Arhour J, Jennings FW, Duncan JL. *Parasitologia Veterinária*. Guanabara Koogan, 2ª edição; 1996.

Valero MA, Darce NA, Panova M, Mas-Coma S. Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Veterinary Parasitology*. 2001; 102 (1-2): 85 – 100.

Valero MA, Panova M, Masc-Coma S. Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image system. *Journal of Helminthology*. 2005; 79: 217 – 225.

Valero MA, Perez-Crespo I, Periago MV, Khoubbane M, Mas-Coma S. Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*. 2009 Aug;111:150-159.

Valero MA, Perez-Crespo I, Khoubbane M, Artigas P, Panova M, Ortiz P, Maco V, Espinoza JR, Mas-Coma S. *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic areas: valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(2):403-410.

Vieira S. Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro. Ed Campus, 1991; 203 pp.

[www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php](http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php). Acessado em 06 de novembro de 2014.

[www.turismo.salta.gov.ar/home](http://www.turismo.salta.gov.ar/home). Acessado em 06 de novembro de 2014.

[www.salta.climatemps.com](http://www.salta.climatemps.com). Acessado em 06 de novembro de 2014.

[www.catamarca.gov.ar](http://www.catamarca.gov.ar). Acessado em 05 de novembro de 2014.