

SILVIA CRISTINA WERLE BOSTELMANN

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO COMPARATIVO EM FÍGADOS
DE BOVINOS (*Bos taurus* L. e *Bos indicus* L.), BUBALINOS
(*Bubalus bubalis* L.) E OVINOS (*Ovis aries* L.)
INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*
(LINNAEUS, 1758)

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias (Área de
Concentração Patologia Veterinária), Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ennio Luz
Co-orientadoras:
Prof.^ª Dr.^ª Vanete Thomaz Soccol
Prof.^ª Silvana Maris Cirio

CURITIBA
2000



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **SÍLVIA CRISTINA WERLE BOSTELMANN** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

1) A Tese, intitulada **“ESTUDO HISTOPATOLÓGICO COMPARATIVO EM FÍGADOS DE BOVINOS (*Bos tauros* E *Bos indicus*), BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) E OVINOS (*Ovis aries*) INFECTADOS POR FASCIOLA HEPATICA”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.

2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito “A” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 23 de maio de 2000.

Prof. Dr. ENNIO LUZ
Presidente/Orientador

Prof. Dr. WALDIR HAMANN
Membro

Prof. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL
Membro

Dedico este trabalho à minha mãe Alzira, ao meu marido Germano e aos meus três adoráveis filhos Camile, Fabiane e Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade concedida pelo curso.

Ao Prof. Dr. Ennio Luz, pela persistência e apoio com que conduziu a orientação deste trabalho.

À Prof^a Silvana Maris Cirio que com paciência e muita dedicação me levou ao maravilhoso mundo da Patologia Animal. Estando sempre disponível e ao meu lado com as orientações necessárias para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Vanete Thomaz Soccol, pelas orientações, sugestões e ensinamentos transmitidos.

À minha amiga Patricia Pimenta Sillos pelo constante apoio e enorme colaboração na realização deste trabalho.

Ao colega Médico Veterinário e Professor Valter da Silva Queiroz pela ajuda no fornecimento de material bibliográfico e valiosa atenção dispensada.

À Tânia Schrank, Deleuse Cherobim, Natália Vieira Borges e Francisco Gerber pela atenção dispensada durante todo o período do curso.

Ao Prof. Dr. Waldir Hamann pelo fornecimento de fígados de ovinos.

Ao Prof. Carlos Roberto Conte Naumann e ao amigo João Biora pelo fornecimento de dados referentes ao serviço de Inspeção Federal do Paraná.

Aos funcionários do Laboratório de Histopatologia Veterinária da UFPR do Setor de Ciências Agrárias, Irene Kozap Urnau e Olair Carlos Beltrame pela importante colaboração nos exames histopatológicos.

À funcionária do Laboratório de Parasitologia da UFPR do Setor de Ciências Agrárias, Maria Rosa Câmara pela ajuda na coleta dos fígados de ovinos.

Ao Prof. Dr. Luiz Mario Fedalto pelo incentivo e apoio para o término deste trabalho.

À Médica Veterinária Elisângela Longo da Secretaria Estadual da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná pela colaboração na coleta de material.

Ao Médico Veterinário Luiz Augusto Martins Gasparetto do Serviço de Inspeção Federal do Frigorífico Argus pela colaboração na coleta de fígados de bovinos e bubalinos.

À Médica Veterinária Cristina Ballista Arrua do Laboratório de Histopatologia do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti.

Aos funcionários Evelin da Silva, Tânia de Barros Baggio, Vera Lúcia Dittert, Maria Helena L. Carvalho e Agrinaldo R. de Lima da Biblioteca do Setor de Ciências Agrárias pela maneira gentil e prestativa com que atenderam às solicitações.

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

E sobretudo a **DEUS**.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	8
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3 RESULTADOS.....	10
3.1 BOVINOS.....	10
3.2 BUBALINOS.....	15
3.3 OVINOS.....	19
4 DISCUSSÃO.....	24
5 CONCLUSÕES.....	29
ANEXOS.....	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – RESULTADOS COM CLASSIFICAÇÃO DE ESCORE EM BOVINOS, BUBALINOS E OVINOS, CURITIBA, 1999.....	23
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EXEMPLARES DE <i>Fasciola hepatica</i> ADULTA	2
FIGURA 2 - ESQUEMA DA EVOLUÇÃO DA <i>Fasciola hepatica</i> . 1. <i>Fasciola hepatica</i> ADULTA; 2. OVO; 3. OVO EMBRIONADO; 4. MIRACÍDIO; 5. ESPOROCISTO JOVEM; 6. ESPOROCISTO COM AS RÉDIAS DE 1º GERAÇÃO; 7. RÉDIAS DE 1ª GERAÇÃO COM RÉDIAS DA 2ª GERAÇÃO; 8. RÉDIAS DA 2ª GERAÇÃO COM CERCÁRIA; 9. CERCÁRIA LIVRE; 10. CERCÁRIA ENCISTADA (METACERCÁRIA). SEGUNDO PESSÔA, 1972.....	4
FIGURA 3 - FÍGADO DE BOVINO. CORTE TRANSVERSAL DE DUCTO BILIAR. FIBROSE DE PAREDE DE DUCTO.....	7
FIGURA 4 - FÍGADO DE BOVINO. CORTE LONGITUDINAL DE DUCTOS BILIARES DILATADOS COM PRESENÇA DE MATERIAL NECRÓTICO NA LUZ.....	7
FIGURA 5 - FÍGADO DE BOVINO COM CORTE DE <i>Fasciola hepatica</i> (Fh) NA LUZ DO DUCTO BILIAR. FIBROSE DE PAREDE (F) – TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 4X.....	11
FIGURA 6 - FÍGADO DE BOVINO. PAREDE DE DUCTO BILIAR COM FORMAÇÕES ACINARES (A) E INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). NUMEROSOS MASTÓCITOS (M) – AZUL DE TOLUIDINA, OBJ. 10X.....	12
FIGURA 7 - FÍGADO DE BOVINO. CORTE DE <i>Fasciola hepatica</i> (Fh) NA LUZ DO DUCTO BILIAR. NECROSE (N) DO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO E FORMAÇÕES ACINARES (A) NA PAREDE. HEMATOXILINA-EOSINA, OBJ. 10X.....	12
FIGURA 8 - FÍGADO DE BOVINO. FIBROSE DE ESPAÇOS PORTA (F) E HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB). TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 10X.....	13
FIGURA 9 - FÍGADO DE BOVINO. FIBROSE EM ESPAÇO PORTA (F). HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB) E INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 40 x.....	13
FIGURA 10 - FÍGADO DE BOVINO. FIBROSE (F) DIFUSA SEVERA. HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB). TRICRÔMICO DE SCHORR. OBJ. 10X.....	14
FIGURA 11 - FÍGADO DE BUBALINO. CORTE DE <i>Fasciola hepatica</i> (Fh) NA LUZ DE DUCTO BILIAR. INTENSA INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI) PERIDUCTAL. HEMATOXILINA-EOSINA, OBJ. 40X.....	16

FIGURA 12 - FÍGADO DE BUBALINO. FIBROSE (F) EM ESPAÇO PORTA COM HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB) E INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). HEMATOXILINA-EOSINA, OBJ. 10X.....	16
FIGURA 13 - FÍGADO DE BUBALINO. FIBROSE (F) EM ESPAÇO PORTA COM INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI) E HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB). TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 40 X	17
FIGURA 14 - FÍGADO DE BUBALINO. FIBROSE (F) MODERADA EM ESPAÇO PORTA. DILATAÇÃO DE DUCTO BILIAR (DD). INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 10X.....	17
FIGURA 15 - FÍGADO DE BUBALINO. ESTENOSE DE ARTÉRIA COM DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO (➡) NA PAREDE. HEMATOXILINA-EOSINA, OBJ. 4X.....	18
FIGURA 16 - FÍGADO DE OVINO. CORTE DE <i>Fasciola hepatica</i> NA LUZ DE DUCTO BILIAR. TRICRÔMICO DE SCHORR, OBJ. 4X.....	20
FIGURA 17 - FÍGADO DE OVINO. ÁREA DE NECROSE (N) COM INTENSA INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). DUCTO BILIAR DILATADO COM FORMAÇÃO DE PREGAS (⇔). HEMATOXILINA – EOSINA, OBJ. 4X.....	20
FIGURA 18 - FÍGADO DE OVINO. ESPAÇO PORTA COM INTENSA INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). HEMATOXILINA – EOSINA, OBJ. 4X.....	21
FIGURA 19 - FÍGADO DE OVINO. ARTERITE E PERIARTERITE. HEMATOXILINA – EOSINA. OBJ. 40 X.....	21
FIGURA 20 - FÍGADO DE OVINO. FIBROSE (F) EM ESPAÇO PORTA. DUCTO BILIAR DILATADO (DD). HIPERPLASIA DE DUCTO BILIAR (DB). TRICRÔMICO DE MALLORY. OBJ. 40X.....	22

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de melhor identificar e estudar comparativamente as lesões histológicas do fígado decorrente da fasciolose hepática em três espécies de animais domésticos. Foram examinados fígados infectados por *Fasciola hepatica* de bovinos e bubalinos provenientes de matadouros e frigoríficos oficialmente inspecionados no Estado do Paraná e fígados de ovinos de propriedades particulares, onde o abate era realizado no local. O material foi processado pela técnica de rotina para histopatologia. As colorações utilizadas foram Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Schorr, Tricrômico de Mallory e Azul de Toluidina. As principais lesões observadas foram cortes de parasitas em ductos biliares, fibrose portal, hiperplasia de ducto biliar, fibrose de parede de ducto biliar e infiltração por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos. Considerando os resultados obtidos, conclui-se que a fasciolose em bovinos e bubalinos se trata de uma fasciolose crônica, principalmente devido a idade de abate ser maior nessas espécies. Nos ovinos o predomínio de eosinófilos caracteriza fase inicial de fasciolose crônica, sendo a idade de abate dos mesmos inferior as outras espécies.

ABSTRACT

This study was performed aiming the best identification as well as a comparative study of histologic liver lesions produced by hepatic fasciolosis in three different species of domestic animals. Bovine and bubaline livers from infected animals were examined, all from slaughterhouses officially inspected in the State of Paraná and livers from sheep from private properties, where animals were locally slaughtered. The samples were processed by means of routine histological methods, and staining procedures included Hematoxilin-Eosin, Schorr (triple staining), Mallory (triple staining) and Toluidine blue. The lesions most frequently observed included parasite sections in biliary ducts, fibrosis of portal system, biliary duct hyperplasia, biliary duct wall hyperplasia, biliary duct wall hyperplasia and lymphocyte, plasmocyte, eosinophil and neutrophil. Considering the results obtained one can conclude that a chronic disease characterizes fasciolosis in bovine and bubaline species, especially due to the more advanced age slaughtering these species are submitted to. As for sheep, the preponderance of eosinophil is typical of the initial phase of chronic fasciolosis and the slaughtering at a earlier age.

1 INTRODUÇÃO

A fasciolose hepática é uma helmintose causada por parasita do filo Plathelminthes, classe Trematoda, sub-classe Digenae, família *Fasciolidae* gênero *Fasciola* (FORTES, 1997). *Fasciola hepatica* acomete o fígado e as vias biliares de muitas espécies de animais domésticos e selvagens, ocasionando prejuízo econômico à pecuária mundial. Este se deve a condenação de fígados nos frigoríficos e matadouros, além da queda de produção do rebanho, qualidade do leite, perda de peso nos animais, assim como, atraso no crescimento, elevando o custo terapêutico no tratamento de freqüentes infecções bacterianas secundárias. A fasciolose se trata também de uma importante zoonose, sendo o homem um hospedeiro acidental do parasito, demonstrando o mesmo, um quadro clínico normalmente grave quando parasitado (HAIBA; SELIM, 1960; DAWES; HUGHES, 1964; TAYLOR, 1965; EUZEBY, 1971; UENO, 1979; BECK, 1984; SERRA-FREIRE, 1995).

Autores descrevem a fasciolose em bovinos, bubalinos e ovinos a nível mundial, dentre eles destacam-se NEVEU LAMAIRE, 1936; CRAIG; FAUST, 1945; GIOVANNONI; KUBIAK, 1947; FERNANDES, 1965; SINCLAIR, 1967; EUZEBY, 1971; REZENDE et al., 1973; FAUST, 1974; MAURI et al., 1980; AMATO, 1982; BUSETTI et al., 1983; FERNANDES; HAMANN, 1985; SUAZO et al., 1989; SERRA FREIRE; NUERNBERG, 1992; SERRA-FREIRE, 1995; LUZ et al., 1996; MATTOS et al., 1997.

Trata-se de uma helmintose comum em nosso meio, onde é conhecida pelos nomes de “baratinha do fígado” ou “saguaipé” e também por “distomatose hepática”. Ocorre em todo o mundo, em regiões onde as condições climáticas (áreas baixas e alagadiças) são adequadas para os moluscos aquáticos que

servem como hospedeiros intermediários para o parasita (CORRÊA, 1971; CARLTON, 1998). Adultos de *Fasciola hepatica* (Figura 1) são parasitas em forma de folha que habitam o sistema biliar do hospedeiro definitivo, mamíferos domésticos e selvagens (BORCHET, 1964; LEITÃO, 1971).



FIGURA 1 – EXEMPLARES DE *Fasciola hepatica* ADULTA .

A ovoposição ocorre nos canais biliares, sendo acumulados na vesícula biliar. Os ovos são expulsos com a bile até o intestino e são eliminados para o exterior, juntamente com as fezes. Para se desenvolverem devem ser separados da matéria fecal e mergulhados na água. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, os miracídios se formam em aproximadamente 15 dias, sendo liberados através do opérculo (CORRÊA, 1971; UENO, 1979; CARLTON, 1998). O Miracídio, descrito pela primeira vez por MEHLIS, em 1851, mede cerca de 140 por 24 micra de largura, sendo piriforme e coberto por cílios vibráteis, que auxilia a sua penetração no hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Lymnaea*. Sobrevive poucas horas em condições adequadas de luminosidade, temperatura e oxigenação da água onde se encontra; morre em 24 horas caso não encontre o hospedeiro adequado. Quando em contato com o hospedeiro intermediário a larva penetra ativamente nos tecidos moles alojando-se na câmara pulmonar do gasterópodo, onde fica imóvel, perde os cílios e se transforma na segunda fase larvar o esporocisto (CORRÊA, 1971; BORCHET, 1964; HATSCHBACH, 1995). SIEBOLD (1804-1885), foi quem primeiro observou a formação do esporocisto a partir do miracídio. É uma vesícula alongada, elíptica, imóvel, com aproximadamente 0,7 mm de comprimento, contendo 5 a 6 núcleos de células germinativas, que poderão se transformar em outros esporocistos, ou formar novas fases larvares: as rédias. Quando liberadas, migram para o hepato-pâncreas e formam uma segunda geração, as rédias-filhas, antes de se transformarem em cercárias (CORRÊA, 1971; HATSCHBACH, 1995). Esta fase larvar é semelhante à forma adulta, diferindo apenas pelo tamanho, presença da cauda e ausência dos órgãos reprodutores, ainda embrionários. As cercárias só são

liberadas na água fixando-se, em qualquer objeto inanimado ou plantas aquáticas por meio da ventosa ventral. Suas células cistogênicas secretam, uma substância viscosa, que envolve totalmente seu corpo, solidificando-se e formando um cisto ou envólucro calcáreo, havendo então perda da cauda. Esta cercária encistada é denominada de metacercária infectante, ou seja, quando ingeridas pelo hospedeiro definitivo, ocorre o seu desencistamento no intestino do mesmo, transformando-se em Fasciola jovem que atinge a cavidade peritoneal e, subseqüentemente, o fígado. Migram no parênquima hepático antes de se alojarem definitivamente nos ductos biliares (UENO, 1979; HASTSCHBACH, 1995) (Figura 2).

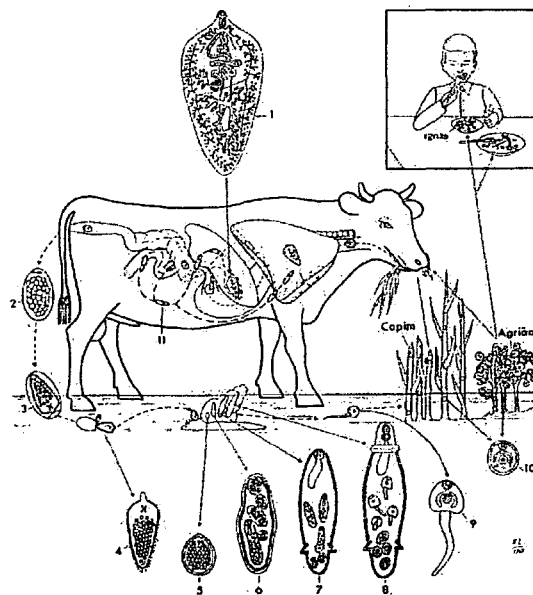


FIGURA 2 -ESQUEMA DA EVOLUÇÃO DA *Fasciola hepatica*. 1. *Fasciola hepatica* ADULTA; 2. OVO; 3. OVO EMBRIONADO; 4. MIRACÍDIO; 5. ESPOROCISTO JOVEM; 6. ESPOROCISTO COM AS RÉDIAS DE 1º GERAÇÃO; 7. RÉDIAS DE 1º GERAÇÃO COM RÉDIAS DA 2ª GERAÇÃO; 8. RÉDIAS DA 2ª GERAÇÃO COM CERCÁRIA; 9. CERCÁRIA LIVRE; 10. CERCÁRIA ENCISTADA(METACERCÁRIA). SEGUNDO PESSÔA,1972.

O parasita necessita de quatro a cinco meses para ter seu ciclo evolutivo completo, ou seja para fazer seu ciclo no hospedeiro intermediário e hospedeiro definitivo. As formas adultas permanecem no ducto biliar durante dois a três anos. As formas imaturas de Fasciola permanecem no parênquima hepático durante 35-45 dias, alimentando-se de sangue e tecidos, causando traumatismo mecânico no fígado, cujo sintoma é característico da fasciolose aguda, causadora de alta mortalidade principalmente em ovinos. No caso destes resistirem a fase inicial, o parasito alcançará o ducto biliar, atingindo o estágio adulto, manifestando-se gradativamente, os sinais clínicos da fasciolose crônica a medida que aumentam em tamanho (JENO, 1979). O parasita é encontrado no interior de ductos biliares causando angiocolite crônica, com dilatação da luz e fibrose da parede (Figura 3) (PESSÔA, 1982; SERRA-FREIRE, 1995; CARLTON, 1998). A colangite crônica e a obstrução do ducto biliar levam à ectasia e estenose dos ductos, bem como a uma fibrose periductular que produz espessamento das paredes ductais (BORCHET, 1964; CARLTON, 1990). A fasciolose aguda é causada pela súbita invasão do fígado por um grande número de trematódas imaturos, ocasionando destruição do parênquima, pela migração, insuficiência hepática e hemorragia na cavidade peritoneal, levando à hepatite aguda hemorrágica. O fígado está grandemente aumentado e hiperêmico, com pequenas hemorragias sob a cápsula. No que se refere ao parênquima hepático propriamente dito, as lesões migratórias agudas tendem a ser traumáticas, no entanto, apresentam também um componente necrótico coagulativo importante, provavelmente correlacionado a algum agente toxigênico liberado pelo parasito (Figura 4). Microscopicamente, estes túneis

mostram hepatócitos degenerados e preenchidos com sangue e detritos, além de pigmentos sangüíneos e eosinófilos. Posteriormente ocorre reparação tecidual com cicatrização, por tecido de granulação. A gravidade da hepatite parasitária traumática é maior em ovinos, sendo inclusive responsável por intensa mortalidade, principalmente quando complicada por bactérias clostridiais e, conseqüentemente menos importante entre os bovinos (BORDIN, 1995; CARLTON, 1998). Admite-se, que o maior grau de infestação dos ovinos seja devido à localização mais baixa da metacercária nas folhas dos pastos, sendo essa região de eleição para ingestão. Os bovinos comem a parte mais alta das folhas, infestando-se menos (CORRÊA, 1971).

Enfatizando bovinos, a hepatite traumática deixa de ser o componente mais importante no contexto lesional, cedendo o seu lugar à forma considerada crônica da doença, que ocorre associada à patologia ducto-biliar. Esta se manifesta quando o parasito, com aproximadamente 6 a 8 semanas pós-infecção, atinge o ducto e determina colângio-hepatite. Esta patologia ocorre pela irritação da mucosa motivada mecanicamente, pela Fascíola, levando inclusive a ulcerações, exsudação fibrinosa e, por vezes, calcificações distróficas (BORDIN, 1995).

O desenvolvimento da patologia crônica ductal como citada depende da freqüência e intensidade da agressão, assim como a duração da mesma. Ocorre entre os bovinos uma resistência inata, ou mais freqüentemente uma imunidade adquirida, que tende a limitar o estabelecimento das lesões e/ou manifestações clínicas aos animais mais novos, em fase de crescimento, o que repercute negativamente em termos de produtividade, ou quando se consideram os resultados globais da relação parasito-hospedeiro na espécie (BORDIN, 1995).



FIGURA 3 – FÍGADO DE BOVINO. CORTE TRANSVERSAL DE DUCTO BILIAR. FIBROSE DE PAREDE DE DUCTO. PRESENÇA DE MATERIAL NECRÓTICO NA LUZ.

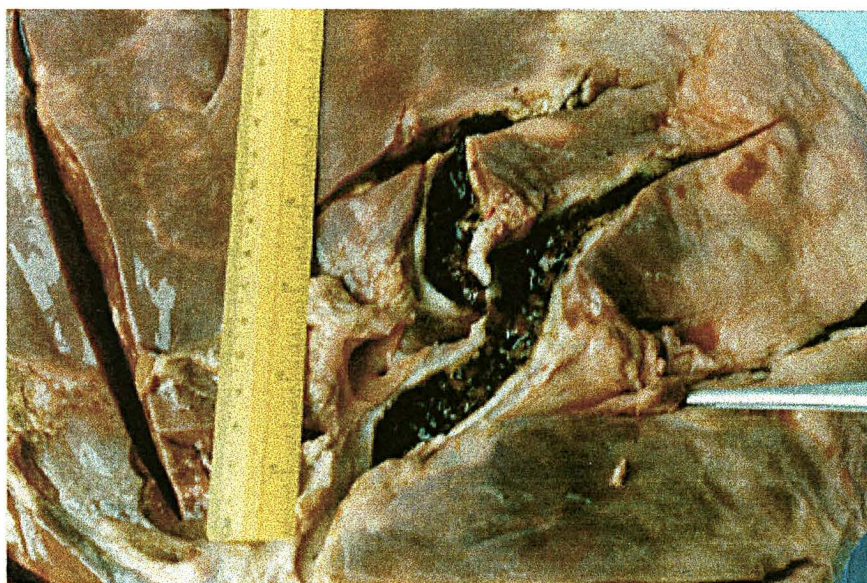


FIGURA 4 – FÍGADO DE BOVINO. CORTE LONGITUDINAL DE DUCTOS BILIARES DILATADOS COM PRESENÇA DE MATERIAL NECRÓTICO NA LUZ.

1.1 OBJETIVOS

Estudar comparativamente os aspectos microscópicos das lesões causadas por *Fasciola hepatica* em fígados de bovinos, bubalinos, e ovinos provenientes de abate para consumo.

Identificar e interpretar as lesões em fígados de Bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) causadas por *Fasciola hepatica*.

Identificar e interpretar as lesões em fígados de Bubalinos (*Bubalus bubalus*) causadas por *Fasciola hepatica*.

Identificar e interpretar as lesões em fígados de Ovinos (*Ovis aries*) causadas por *Fasciola hepatica*.

Comparar as lesões entre as espécies estudadas;

Comparar com as lesões com os dados já descritos na literatura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Histopatologia Veterinária, vinculado ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, onde foi realizado o processamento e leitura do material para histopatologia.

Os fígados de bovinos e bubalinos são provenientes de matadouros e frigoríficos oficialmente inspecionados na cidade de São José dos Pinhais e

Bocaiúva do Sul, ambas no Estado do Paraná, sendo que os fígados da espécie bubalina são animais oriundos da cidade de Morretes, litoral paranaense, e São José dos Pinhais. Os fígados da espécie ovina foram coletados em pequenas propriedades na cidade de Quatro Barras e Fazenda Rio Grande, Paraná, onde o abate era realizado ali mesmo, isto devido, a pequena quantidade de abate oficialmente inspecionado em ovinos no Estado do Paraná.

Foram analisados quatro fígados de cada espécie acima citada, infectados por *Fasciola hepatica*, comprovado por exame macroscópico.

Os cortes de fígados das três espécies foram fixados em solução de formol a 10% por vinte e quatro horas. Após a fixação, foi desidratado, diafanizado, incluído em parafina e realizado cortes de cinco micrômetros e em seguida corados. As colorações utilizadas foram Hematoxilina-Eosina (Anexo 1) por ser a técnica de rotina universal para histologia e histopatologia, Tricrômico de Schorr (Anexo 2) e Tricrômico de Mallory (Anexo 3) com a finalidade de evidenciar o tecido conjuntivo fibroso e Azul de Toluidina (Anexo 4) para evidenciar os mastócitos (BÜCHERL, 1965). Após o estudo histopatológico, lâminas foram selecionadas e fotomicrografadas.

3 RESULTADOS

3.1 BOVINOS

Os cortes histológicos dos fígados dos bovinos corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina, Azul de Toluidina, Tricrômicos de Schorr e Mallory apresentam ductos biliares dilatados, com fibrose de parede e presença de cortes de *Fasciola hepatica* adulto íntegro (Figura 5). Em um dos fígados, o parasita na luz do ducto está degenerado e o conteúdo parcialmente calcificado. Em todos eles há ainda detritos celulares na luz. As paredes dos ductos mais calibrosos estão espessadas, com formações acinares irregulares compostas por epitélio colunar alto, distribuídas no terço médio da parede, infiltradas por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos (Figura 6). Internamente o epitélio de revestimento dos ductos apresentam áreas de necrose ou está ausente de forma focal (Figura 7). Em um dos fígados há calcificação do parasita e também da parede.

No terço externo da parede do ducto há infiltração linfoplasmocitária e neutrofílica escassa.

Em todos os fígados existe hiperplasia de ductos biliares em espaços Porta e proliferação de tecido conjuntivo fibroso (Figuras 8 e 9). A infiltração por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos varia de moderada a intensa. Há também presença de mastócitos.

Em dois fígados há necrose focal com presença de macrófagos e poucos eosinófilos.

Em um dos fígados existe área de necrose antiga com tecido de granulação e macrófagos com hemossiderina. Há também a presença de fibrose difusa (Figura 10).

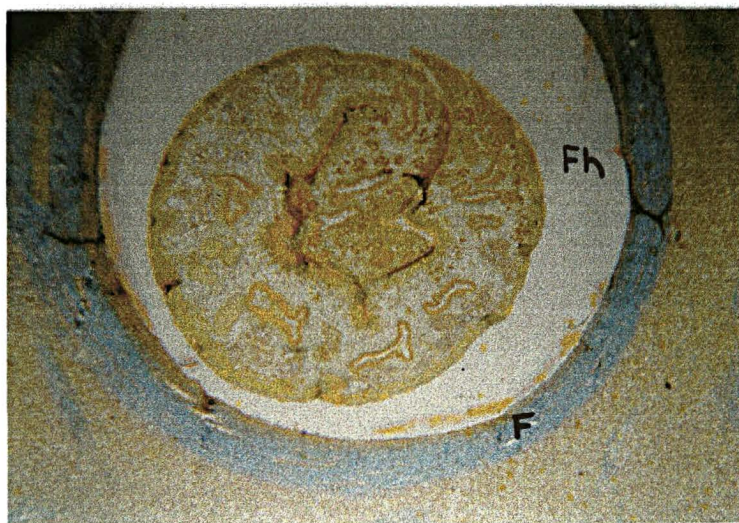


FIGURA 5 – FÍGADO DE BOVINO COM CORTE DE *Fasciola hepatica* (Fh) NA LUZ DO DUCTO BILIAR. FIBROSE DE PAREDE (F) - TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 4X.

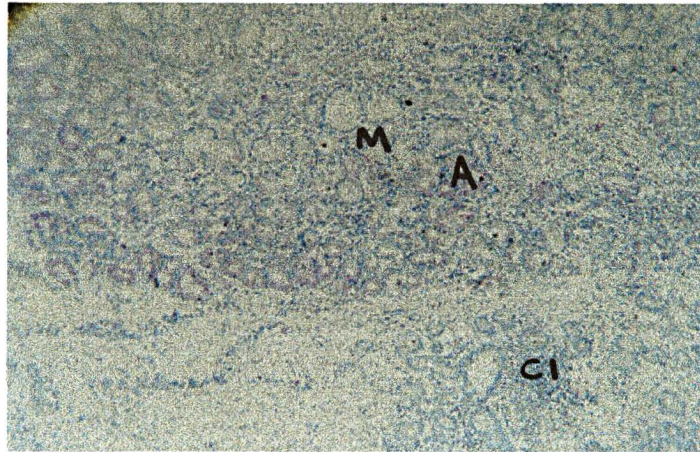


FIGURA 6- FÍGADO DE BOVINO. PAREDE DE DUCTO BILIAR COM FORMAÇÕES ACINARES (A) E INFILTRAÇÕES POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI) NUMEROSOS MASTÓCITOS (M) AZUL DE TOLUIDINA, OBJ. 10X.

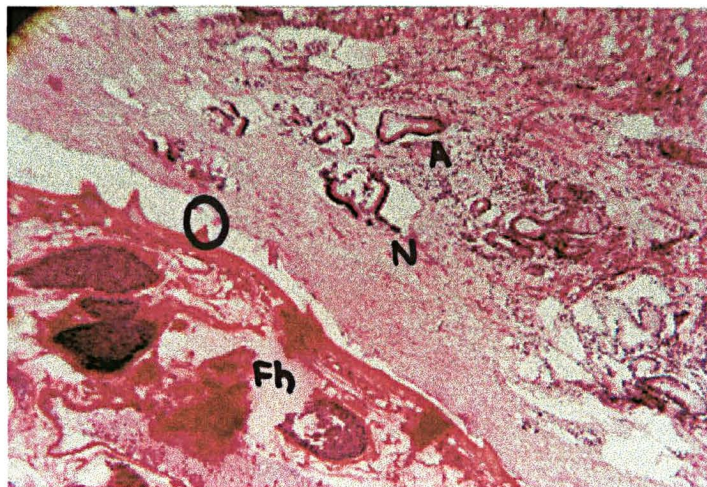


FIGURA 7 - FÍGADO DE BOVINO. CORTE DE *Fasciola hepatica* (F.h) NA LUZ DE DUCTO BILIAR. NECROSE (N) DO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO, FORMAÇÕES ACINARES (A) NA PAREDE COM PRESENÇA DE ESPINHOS DO PARASITA (O). HEMATOXILINA-EOSINA, OBJ. 10X.

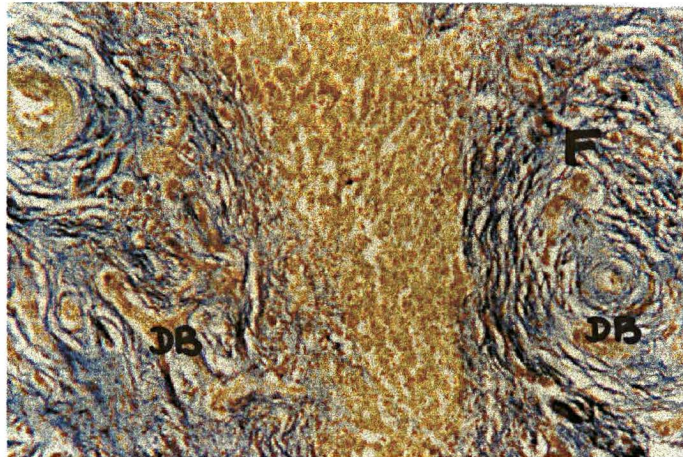


FIGURA 8 - FÍGADO DE BOVINO. FIBROSE DE ESPAÇOS PORTA (F) E HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB). TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 10 X.

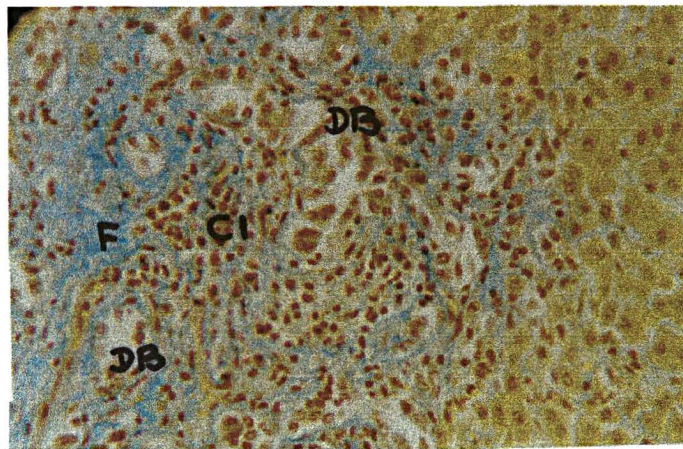


FIGURA 9 - FÍGADO DE BOVINO. FIBROSE DE ESPAÇOS PORTA (F). HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB) E INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 40 X.

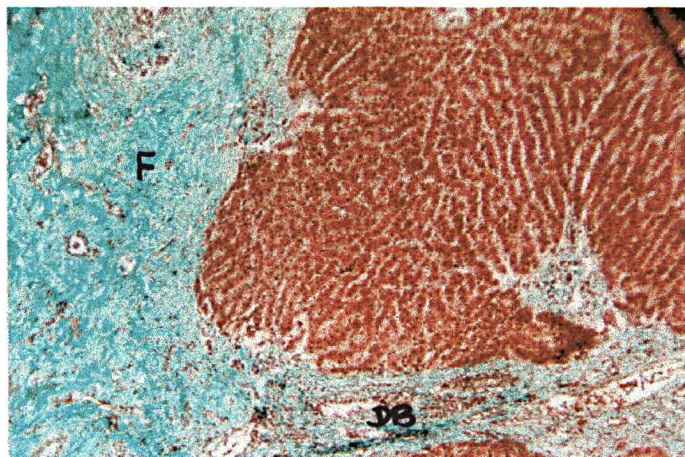


FIGURA 10 - FÍGADO DE BOVINO. FIBROSE (F)
DIFUSA SEVERA. HIPERPLASIA
DE DUCTOS BILIARES (DB).
TRICRÔMICO DE SCHORR. OBJ.
10 X.

3.2 BUBALINOS

Nos cortes histológicos dos fígados dos bubalinos corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina, Azul de Toluidina, Tricrômicos de Schorr e Mallory existem ductos dilatados com corte de parasita em todos os fígados estudados. As paredes estão espessadas e apresentam a partir da porção média interna formações acinares revestidas por epitélio colunar alto e infiltradas por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. Adjacente aos ductos há necrose moderada do parênquima. O revestimento interno dos ductos está ausente na maior parte.

Em alguns ductos com corte de parasita observa-se infiltração linfoplasmocitária com localização periductal, variando de moderada a intensa (Figura 11). Existe hiperplasia de ductos biliares em espaços Porta de forma leve (Figura 12 e Figura 13).

O infiltrado inflamatório nos espaços Porta é leve a moderado, composto por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. Mastócitos estão presentes em apenas um dos fígados. O grau de fibrose neste local também varia de leve a moderado, existindo ainda edema (Figura 14).

As artérias das tríades portais apresentam deposição de colágeno na parede e estenose (Figura 15).

Fibrose difusa não é observada nos fígados estudados.

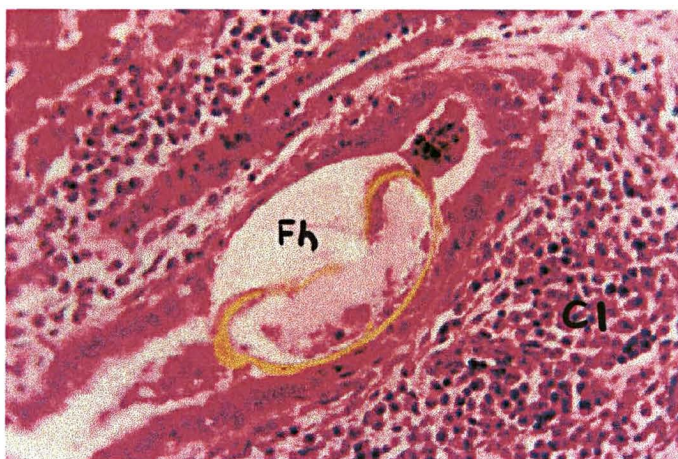


FIGURA 11 - FÍGADO DE BUBALINO. CORTE DE *Fasciola hepatica* (Fh) NA LUZ DE DUCTO BILIAR. INTENSA INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI) PERIDUCTAL. HEMATOXILINA-EOSINA, OBJ. 40 X.

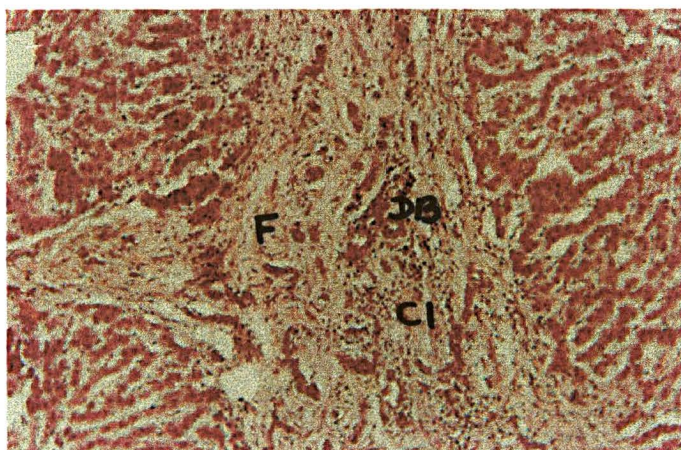


FIGURA 12 - FÍGADO DE BUBALINO. FIBROSE (F) EM ESPAÇO PORTA COM HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB) E INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). HEMATOXILINA - EOSINA, OBJ. 10 X.

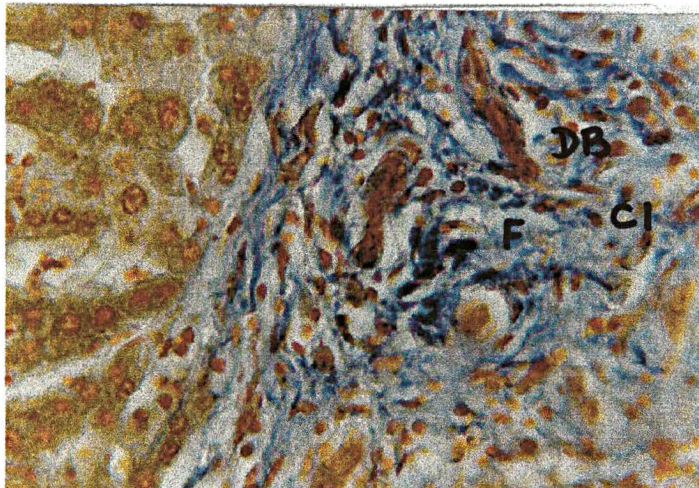


FIGURA 13 - FÍGADO DE BUBALINO. FIBROSE (F) EM ESPAÇO PORTA COM INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI) E HIPERPLASIA DE DUCTOS BILIARES (DB). TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 40 X.

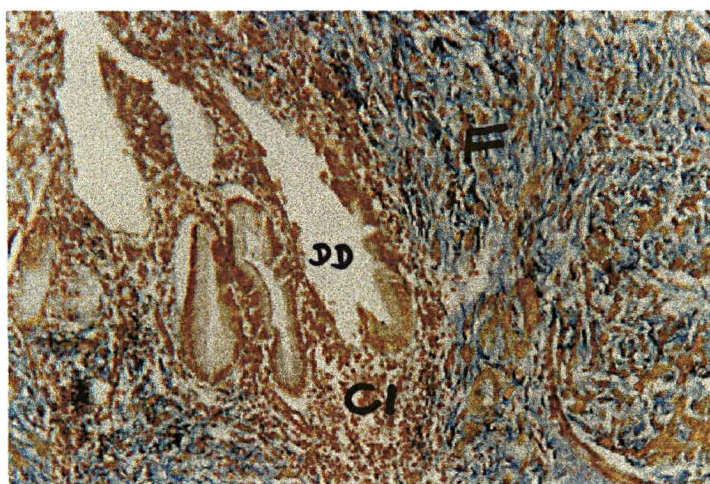
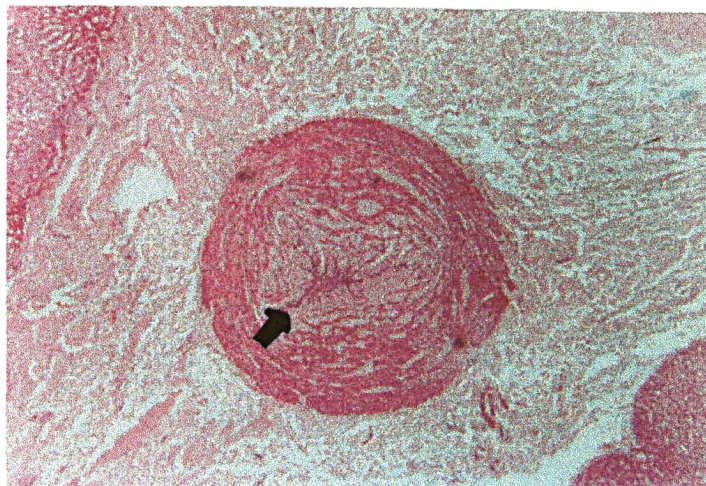


FIGURA 14 - FÍGADO DE BUBALINO. FIBROSE (F) MODERADA EM ESPAÇO PORTA. DILATAÇÃO DE DUCTO BILIAR (DD). INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). TRICRÔMICO DE MALLORY, OBJ. 10 X.



**FIGURA 15 - FÍGADO DE BUBALINO.
ESTENOSE DE ARTÉRIA COM
DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO (→)
NA PAREDE. HEMATOXILINA-
EOSINA, OBJ. 4X.**

3.3 OVINOS

Os cortes histológicos dos fígados dos ovinos foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina, Azul de Toluidina, Tricrômicos de Schorr e Mallory. Três dos fígados dos ovinos apresentam corte de parasita íntegro na luz dos ductos biliares (Figura 16). A parede dos ductos está espessada por tecido fibroso e isenta de epitélio de revestimento interno. Alguns ductos apresentam hiperplasia do epitélio de revestimento com formação de pregas (Figura 17).

Adjacente aos ductos afetados existe necrose de hepatócitos.

Nos quatro fígados observam-se áreas irregulares de necrose com hemorragia. Em áreas de necrose antiga há reação granulomatosa com presença de células gigantes multinucleadas e macrófagos com hemossiderina. Em um dos fígados existem ovos do parasita envoltos pelo tecido de granulação.

A fibrose e hiperplasia de ductos biliares em espaços Porta varia de leve a moderada. Também existe estenose de vasos da tríade Portal em três fígados.

Há intensa infiltração eosinofílica em espaços Porta (Figura 18), com arterite e flebite (Figura 19), e hiperplasia de ductos biliares em um dos fígados (Figura 20), em outro fígado observam-se edema no espaço Porta e presença de focos linforreticulares distribuídos difusamente no parênquima.



FIGURA 16 - FÍGADO DE OVINO. CORTE DE *Fasciola hepatica* NA LUZ DE DUCTO BILIAR. TRICRÔMICO DE SCHORR, OBJ. 4X.

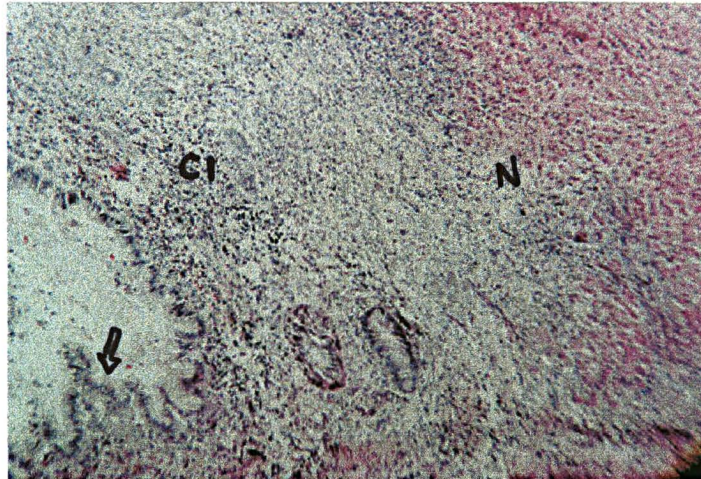


FIGURA 17 - FÍGADO DE OVINO. ÁREA DE NECROSE (N) COM INTENSA INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). DUCTO BILIAR DILATADO COM FORMAÇÃO DE PREGAS (⇔). HEMATOXILINA-EOSINA, OBJ. 4X.

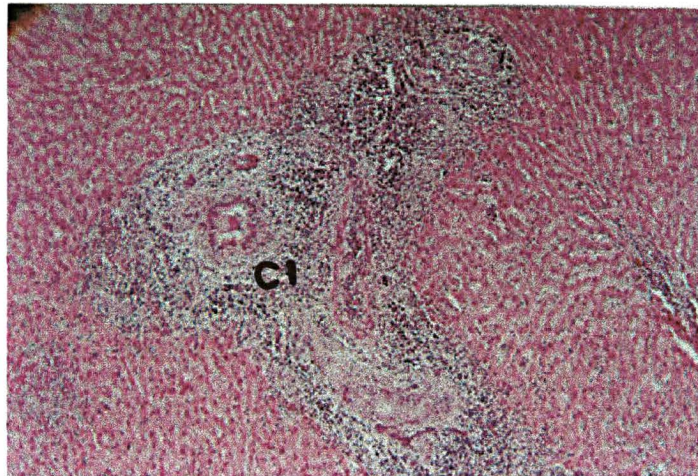


FIGURA 18 - FÍGADO DE OVINO. ESPAÇO PORTA COM INTENSA INFILTRAÇÃO POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI). HEMATOXILINA - EOSINA, OBJ. 4X.

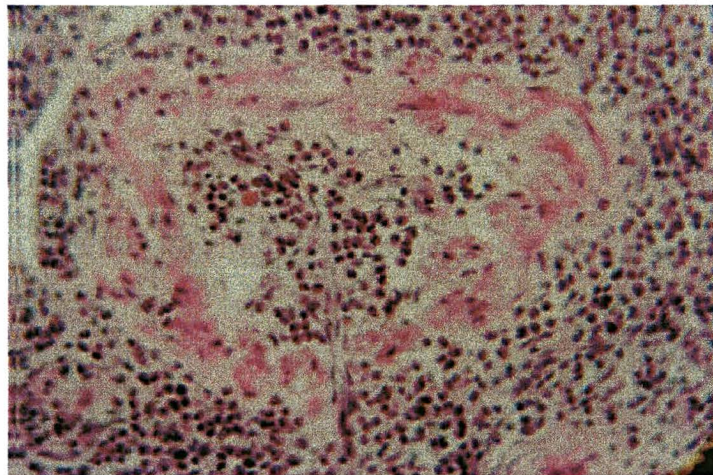


FIGURA 19 - FÍGADO DE OVINO. ARTERITE E PERIARTERITE. HEMATOXILINA-EOSINA. OBJ. 40 X.

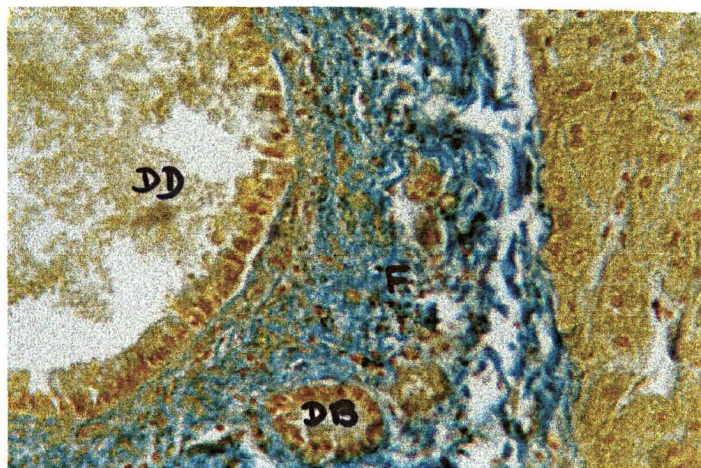


FIGURA 20 - FÍGADO DE OVINO. FIBROSE (F) EM ESPAÇO PORTA. DUCTO BILIAR DILATADO (DD). HIPERPLASIA DE DUCTO BILIAR (DB). TRICRÔMICO DE MALLORY. OBJ. 40 X.

QUADRO 1 - RESULTADOS COM CLASSIFICAÇÃO DE ESCORE EM BOVINOS, BUBALINOS E OVINOS, CURITIBA, 1999.

Lesões	Bovinos				Bubalinos				Ovinos			
	BV-1	BV-2	BV-3	BV-4	BB-1	BB-2	BB-3	BB-4	OV-1	OV-2	OV-3	OV-4
Cortes de parasitas em ductos biliares	P	0	P	P	P	P	P	P	P	P	P	0
Fibrose de espaço Porta	+++	+	++	+++	+	+	+	++	++	+	+	+
Hiperplasia dos ductos biliares	+++	++	++	++	+	+	+	+	++	+	+	+
Fibrose de parede de ducto biliar	++	+	+	+	++	+++	++	++	+	0	+	+
Infiltração por linfócitos e plasmócitos	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	++	+
Infiltração por neutrófilos	+	+	+	++	0	0	0	Raros	+++	0	++	++
Infiltração por eosinófilos	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
Presença de Mastócitos	P	P	P	P	P		0	0	0	0	0	0
Estenose de vasos	0	0	0	0	P	P	P		P	P	P	0
Tecido de Granulação	P	P	P	P	0	0	0	0	P*	P	P	P
Áreas de necrose	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Fibrose difusa	P	P	P	P	0	0	0	0	P	P	P	0
Lesão de ductos biliares calibrosos	P	P	P	P	P	P	P	P	0	0	0	0
- Formações acinares	P	P	P	P	P	P	P	P	0	0	0	0
- Necrose do epitélio de revestimento	P	P	P	P	P	P	P	P	0	0	0	0
- Infiltração por células inflamatórias	P	P	P	P	P	P	P	P	0	0	0	0

Legenda: Escore: Leve: + Moderada: ++ Severa: +++ Ausente: 0 Presente: P

* Em Ov-1 há presença de ovos do parasita na reação granulomatosa.

4 DISCUSSÃO

A ação do parasita sobre o tecido do hospedeiro é evidenciada pelos danos hepatobiliares e a resposta ao parasita por reações fibrocelulares. Nos cortes histológicos dos fígados estavam presentes cortes de *Fasciola hepatica* adulta nos ductos biliares nas três espécies estudadas, bovinos, bubalinos e ovinos. No presente trabalho não foi observado o parasita adulto no parênquima hepático das três espécies estudadas. A presença do parasita adulto nos ductos biliares também foi observado por outros autores como ROSS et al., 1966; SINCLAIR, 1967; FREIRE, 1967; DOW et al., 1968; BARNOUIN, 1981; PESSÔA, 1982; RICKARD; FOREYT, 1992; RAMOS et al., 1993; BORDIN, 1995; CARLTON, 1998. BORCHET, 1964; UENO, 1979; PESSÔA, 1982; SERRA-FREIRE, 1995 e CARLTON, 1998, relatam que a presença do parasita adulto indica fasciolose como forma crônica. Na espécie bovina apenas um dos quatro fígados estudados tal característica não foi evidente.

SCHUSTER; LAMMLER, 1973, em experimento com cinco ratos albinos infectados por *F. hepatica*, encontraram em um deles, parasita adulto no parênquima hepático.

Neste estudo a fibrose de espaço Porta foi observada no bovino e ovino como descrevem ROSS, 1966, 1967; RUSHTON; MURRAY, 1977; RICKARD; FOREYT, 1992; SADJJADI; ORYAN, 1997, a qual no ovino aumenta com a

progressão da doença (DOW et al., 1967). A fibrose no espaço Porta dos fígados dos bubalinos mostrou-se de forma leve.

A hiperplasia de ductos biliares em espaços Porta trata-se de uma alteração proeminente nesta doença. Foi observada nas três espécies estudadas, sendo mais evidente em bovinos, com relação aos bubalinos e ovinos. Tais observações são compatíveis com as que descrevem DOW 1967, 1968; SIQUEIRA, 1971; RUSHTON; MURRAY, 1977; SANTOS, 1979; PESSÓA, 1982; RICKARD, 1992; SADJJADI, 1997.

RICKARD; FOREYT, 1992, através de experimento de fasciolose em lhamas e ovinos, relata semelhanças com relação ao grau de hiperplasia de ductos biliares em fígados dessas duas espécies, o qual era similar ao descrito para fasciolose crônica em ovinos e bovinos. Nesta última espécie ela é mais evidente a partir da 8ª semana pós-infecção (ROSS et al., 1966).

Em infecção experimental de ovinos por *Fasciola hepatica*, DOW et al., 1967; afirmam que a hiperplasia de ductos biliares ocorreu a partir de quatro a cinco semanas pós-infecção, sendo mais acentuada com aproximadamente onze semanas pós-infecção.

A idade de abate no Estado do Paraná de bovinos é de aproximadamente trinta e seis meses, a de bubalinos está entre vinte e quatro a trinta meses, e a dos ovinos em torno de seis meses (NAUMANN CONTI, 2000). É possível que a diferença observada com relação a hiperplasia de ductos biliares esteja relacionada com o período de evolução da doença. De acordo com MACEDO, 1987; um grande obstáculo que se encontra para a identificação da fasciolose em ovinos é que a maioria dos animais são abatidos sem fiscalização nas

propriedades rurais e poucos são abatidos em frigoríficos ou matadouros com os devidos exames do Serviço de Inspeção, são jovens e ainda não foram contaminados pela doença.

Áreas de necrose no parênquima hepático estavam presentes nos bovinos, bubalinos e ovinos, mas sem evidência de túneis de hepatócitos degenerados e preenchidos com sangue e detritos, além de pigmentos sangüíneos e eosinófilos, os quais caracterizam fasciolose aguda como descrevem BORDIN, 1995; CARLTON, 1998.

Nos bovinos estudados, a necrose era variável. Segundo ROSS, 1966, a necrose focal com presença de macrófagos e poucos eosinófilos ocorre entre 5 a 6 semanas pós infecção, a qual foi observada em dois dos fígados. O mesmo autor descreve área de necrose com tecido de granulação e fibrose difusa entre 7 e 8 semanas pós infecção, como foi observado nos outros dois fígados dos bovinos do presente estudo.

A necrose observada nos bubalinos é aquela que acontece adjacente aos ductos biliares, os quais apresentam deposição de colágeno e estenose, sem sinal de conseqüência da migração do parasita como cita ROSS et al., 1966 em bovinos e RUSHTON, 1977 em ovinos.

Nos ovinos estudados, a necrose é variável. RUSHTON, 1977, descreve áreas de necrose com hemorragia em até seis semanas pós infecção. Tais lesões foram observadas em todos os fígados desta espécie. Mas em um deles existe ainda reação granulomatosa com presença de células gigantes multinucleadas e macrófagos com hemossiderina, e em outro há ovos de parasitas envolvidos por tecido de granulação. Ambas as lesões são características de seis semanas pós

infecção e trinta semanas pós infecção, respectivamente, segundo RUSHTON, 1977. A fibrose difusa ocorre em três dos fígados desta espécie.

A infiltração por células inflamatórias está presente em todos os casos de fasciolose desde o início da infecção hepática de acordo com os autores ROSS, 1966; SINCLAIR, 1967; DOW, 1968; SCHUSTER, 1973; RUSHTON, 1977; PESSÔA, 1982; RICKARD; FOREYT, 1992; BORDIN, 1995, variando a população de células conforme a evolução da doença.

Nos bovinos os tipos celulares que predominaram nos espaços Porta foram os linfócitos e plasmócitos com menor quantidade de neutrófilos e eosinófilos.

Segundo ROSS, 1966, tais células caracterizam os períodos pós infecção entre sete e onze semanas.

Nos bubalinos estudados a infiltração era leve a moderada por linfócitos e plasmócitos, e leve por eosinófilos. Em um dos fígados haviam raros neutrófilos, e mastócitos estavam presentes em outro.

ROSS, 1966 descreve lesão de ductos biliares calibrosos de bovino pela *Fasciola* a partir de nove semanas pós infecção, onde observam-se, aumento da espessura da parede, com formação de estruturas acinares irregulares na porção interna e revestida por epitélio colunar alto, além de infiltração eosinofílica da porção média externa. Nos bovinos estudados existem numerosos ductos biliares com lesões semelhantes, havendo diferença apenas na localização das formações acinares que estariam dispostas ao longo do terço médio das paredes, com infiltração nos linfócitos, plasmócitos e eosinófilos.

Um dos fígados de bovino apresenta também calcificação da parede de ducto, lesão descrita por ROSS, 1966 a partir de vinte e três semanas pós infecção.

Nos fígados dos bubalinos estudados também existem formações acinares a partir da porção média interna das paredes de ductos biliares calibrosos, com infiltração por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, além de fibrose da parede.

Não foram observados cistos de mucina no epitélio de ductos biliares nos fígados dos ovinos estudados, como descreve RUSHTON, 1977, a partir da trigésima semana pós infecção.

Somente nos bubalinos foi observada estenose de vasos da tríade portal, lesão observada por RUSHTON, 1977 em ovinos a partir da primeira semana pós infecção. Esse autor descreve também arterite e flebite na tríade portal como presentes na fase inicial da infecção. Nos fígados dos ovinos estudados também foram observadas tais lesões.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, chegou-se às seguintes conclusões:

- 1) o tempo de infecção nos fígados de bovinos e bubalinos estudados é superior a nove semanas, indicando uma fasciolose crônica, isto se deve também a presença de parasitas adultos no interior dos ductos biliares.
- 2) observou-se parasita adulto na luz de ductos biliares nos fígados de ovinos, indicando infecção precoce, uma vez que esses animais são abatidos com aproximadamente seis meses de idade.
- 3) o grau de fibrose da parede dos ductos biliares dos bovinos e bubalinos é maior que dos ovinos, pela maior progressão da doença devido a idade do abate do bubalino ser entre vinte e quatro a trinta meses e do bovino trinta e seis meses.
- 4) devido a presença de eosinófilos em ovinos ser maior que em bovinos e bubalinos, concluímos que a fasciolose em ovinos está mais próxima da fase crônica inicial.
- 5) ovinos foi a única espécie que apresentou ovos do parasita na reação granulomatosa, fato esse que merece maior estudo.

- 6) em geral, as lesões nos fígados dos bubalinos em relação aos bovinos e ovinos são observadas com menor intensidade, demonstrando que possivelmente há maior resistência desta espécie à ação da *Fasciola hepatica*.
- 7) no total as lesões observadas em espaço Porta dos fígados de bovinos são mais acentuadas.
- 8) a presença de mastócitos nos bovinos, em fase de fasciolose crônica necessita maior estudo, tendo em vista que nas helmintoses em geral eles estão presentes na fase inicial da doença.
- 9) as colorações Tricrômicas de Schorr e Mallory comprovaram a sua eficiência ao evidenciar o tecido conjuntivo fibroso.

ANEXOS

ANEXO 1 – ESQUEMA DE COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

Desparafinização	Xilol	10 min
	Alcool I	5 min
	Alcool II	5 min
	Água	5 min
Corante	Hematoxilina	5 min
Viragem	Cabonato de Lítio	5 min
Corante	Eosina	10 min
Desidratação	Alcool I	5 min
	Alcool II	5 min
	Alcool III	5 min
	Alcool IV	5 min
Diafanização	Xilol fenicado	10 min
	Xilol I	5 min
	Xilol II	5 min
Montagem da lâmina com entelan		

ANEXO 2 – ESQUEMA DE COLORAÇÃO COM TRICRÔMICO DE SHORR

Desparafinização	Xilol	10 min
	Álcool I	5 min
	Álcool II	5 min
	Lavar em água	5 min
Corante	Hematoxilina	5 min
Viragem	Carbonato de Lítio	5 min
Corante	Schorr	10 min
Desidratação	Álcool I	5 min
	Álcool II	5 min
	Álcool III	5 min
	Álcool IV	5 min
Diafanização	Xilol fenicado	10 min
	Xilol I	5 min
	Xilol II	5 min
Montagem da lâmina com entelan		

ANEXO 3 – ESQUEMA DE COLORAÇÃO COM TRICRÔMICO DE MALLORY

Desparafinização	Xilol	10 min
	Álcool I	5 min
	Álcool II	5 min
	Lavar em água	5 min
Corante	Hematoxilina	5 min
Viragem	Carbonato de Lítio	5 min
Corante	Mallory	10 min
Desidratação	Álcool I	5 min
	Álcool II	5 min
	Álcool III	5 min
	Álcool IV	5 min
Diafanização	Xilol fenicado	10 min
	Xilol I	5 min
	Xilol II	5 min
Montagem da lâmina com entelan		

ANEXO 4 – ESQUEMA DE COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA

Desparafinização	Xilol	10 min
	Álcool I	5 min
	Álcool II	5 min
	Lavar em água	5 min
Corante	Hematoxilina	5 min
Viragem	Carbonato de Lítio	5 min
Corante	Azul de Toluidina	10 min
Desidratação	Álcool I	5 min
	Álcool II	5 min
	Álcool III	5 min
	Álcool IV	5 min
Diafanização	Xilol fenicado	10 min
	Xilol I	5 min
	Xilol II	5 min
Montagem da lâmina com entelan		

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AMATO, S.B.; REZENDE, H.E.B.; GOMES, D.C.; SERRA FREIRE, N.M.; ARAÚJO, J.L.B. Epidemiologia da fasciolose hepática no Vale do Paraíba: resultado do 1º ano de estudo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA (7.: Porto Alegre,1982) **Resumos**. p.35.
- 2 BARNOUIN, J. MIALOT M. ; LEVIEUX D. Évaluation de la Pathologie hépatique des Bovins sur un Prélèvement de Sang. Relations Avec L'histopathologie **Ann.Rech.Vét**, [S.l] V.12, n.4, p. 363-369. 1981.
- 3 BECK, A.H, Fasciolose em bovinos - **Revista Balde Branco**, São Paulo, n.231, p. 6 - 10. jan, 1984.
- 4 BORCHET, A. **Parasitologia veterinária** . 3ªed. Zaragoza: Acribia, 1964.
- 5 BORDIN, E.L. Revisão da anatomia patológica da fasciolose bovina, Porto Alegre, **A Hora Veterinária**, Edição extra Porto Alegre, n. 1, p.33-35, jul, 1995.
- 6 BÜCHERL, W. **Técnica Microscópica**. 3. ed. São Paulo: Polígono. 1965.
- 7 BUSETTI, E. T. Contribuição ao estudo da *Fasciola hepatica* Linæus, 1758 (Trematoda-Fasciolidae) no Estado do Paraná, Brasil. **Tese** (Livre docência) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1985.
- 8 BUSETTI, E.T.; PASKE, A. ; GARCIA, E. Incidência parasitária em *Bubalus Bubalis* I. **Arq. Biol. Tecnol**, Curitiba, v. 24, n. 3, p. 397-398, 1981.
- 9 CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial deThomson**, 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p 108-115.
- 10 CORRÊA, O. **Doenças parasitárias dos animais domésticos**, Porto Alegre:Sulina, 1971.
- 11 CRAIG, C. F.; FAUST, E.C. **Parasitologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1945.
- 12 DAWES, B.; HUGHES, D.L. Fascioliasis. The invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. **Adv. Parasitol.**,[S.l] n. 2 p. 97-165, 1964.
- 13 DOW, C., ROSS J. G.; TODD J. R. The Pathology of experimental fascioliasis in Calves. **Journal of Comparative Pathology**. [S.l.] n. 77, p. 377-386, 1967.
- 14 DOW, C., ROSS J. G.; TODD J. R.. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. **Parasitology**. [S.l.], n. 58, p.129-135, 1968.
- 15 EUZEBY, J. **Helminthoses of domestics animals**. Paris: Vigot Frères, 1971.
- 16 FAUST, E.C.; RUSSEL, P.F. e JUNG, R.C. **Parasitologia clínica**. São Paulo:Salvat, 1974.

- 17 FERNANDES, B. F. e HAMANN, W. Considerações sobre a verminose em bovinos e bubalinos no litoral Paranaense. **Revista do Setor de Ciências Agrárias, UFPR**, Curitiba, v.7, p.137-140, 1985.
- 18 FERNANDES, B. F. Parasitas de animais domésticos no Paraná. Curitiba, 1965. Tese, (Livre docência), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- 19 FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. São Paulo: Cone 3, 1997.
- 20 FREIRE, J.J. Fauna Parasitária Riograndense. Introdução, boi, ovelha e cabra. **Ver. Med. Vet.**, São Paulo, v.3, n.2, p.143-158, 1967.
- 21 GIOVANNONI, M. ; KUBIAK, G.V.L. Fauna parasitológica IV: lista prévia da ocorrência de helmintos em animais domésticos. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, n.2, p.225-232, 1947.
- 22 HAIBA, M.H.; SELIM, M.K. Detailed study on the morphological status of Fasciola worms infesting buffaloes, cows and sheep in Egypt. **Z. Parasitenk.**, n.19, p.525, 1960.
- 23 HATSCHBACH, P.I., "A *Fasciola hepatica* e sua história" - Revista "A Hora Veterinária", Porto Alegre, Edição extra n.1, jul 1995.
- 24 JUBB, K.V.F. ; KENNEDY, P.C. **Pathology of domestic animals**. 2 ed. New York: Academic, 1970.
- 25 LEITÃO J.S. **Parasitologia veterinária**. 2ª edição - I Volume - Parasitas, Fundação Calouste Gulbenkian - Lisboa, 1972.
- 26 LUZ, E., GAZDA, C.M. ; YADA, R.S. Animal fascioliasis in the State of Paraná Brazil – Data Analysis. **Arq. Biol. Tecnol.** Curitiba, v.35, n.4, p.777-780, dez. 1992.
- 27 MACEDO, J.B.R. Os prejuízos da fasciolose para bovinos e ovinos, **Revista dirigente rural**, V. 26, n. 12 , p. 34-37, dez. 1987.
- 28 MATTOS, M.J.T.; UENO, H.; GONÇALVES, P. C. et al. Ocorrência estacional e bioecologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 (*Mollusca, Lymnaeidae*) em habitat natural no Rio Grande do Sul. **R. Bras. Med. Vet.**, [S.l] v.19, n.6, p.248-251, 1997.
- 29 NAUMANN CONTE C.R. (Comunicação pessoal), Curitiba, 2000.
- 30 NEVEU LEMAIRE, M. **Traité d'helminthologie Médicale et Veterinaire**. Paris, Vigot Frères, 1936.
- 31 PESSÔA, S.B; **Parasitologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972.
- 32 PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- 33 RAMOS, A. M., ROMERO, H.Q., MOLINA, C.G. MARTINEZ, M.H. Frecuencia de fascioliasis através de cuatro técnicas de diagnóstico em toros sacrificados en la plaza México. **Vet. Méx.**, v.24, n.3, p. 239-241, 1993.

- 34 REZENDE, H. E. B.; ARAÚJO, J. L. B. ; GOMES, P.A.C. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea Lamark*, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no Estado do Rio de Janeiro. (*Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae*). **Arq. Univ. Fed. Rur.**, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p.21-23, 1973.
- 35 RICKARD, L.G.; FOREYT, W.J. Experimental fascioliasis in llamas. **J. Helminthol. Soc. Wash.**, Washington, v. 59, n. 1, p. 140-144, 1992.
- 36 ROSS, J.G., TODD J. R. ; DOW C. Single experimental infections of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Journal of Comparative Pathology** [S.l.], n.76, p.67-81, 1966.
- 37 RUSHTON, B. and MURRAY M. Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. **Journal of Comparative Pathology** , [S.l.], v.87, p. 459-470, 1977.
- 38 SADJJADI, S.M.; TAKI, T.M.; ORYAN, A. Quantitative histopathology of liver and portal lymphnode in chronic bovine fascioliasis. **Indian Journal of Animal Sciences**, [S.l.] v. 67,n.4, p. 270-274, 1997.
- 39 SANTOS, J. A. **Patologia geral dos animais domésticos (mamíferos e aves)**, 2. ed. Rio de Janeiro: Interamericana. 1978.
- 40 SANTOS, J.A. **Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves)** 2.ed. Rio de Janeiro: Interamericana. 1979.
- 41 SCHUSTER, J.; LAMLER, G. *Fasciola hepatica* infection of the albino rat. I studies on the development and pathophysiology. **Z. Parasitenk.**, [S.L] v.41, n.4, p.311 – 326, 1973
- 42 SERRA- FREIRE.; NUERNBERG, Geopolitical dispersion of the occurrence of *Fasciola hepatica* in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Londrina, v.87 p.263-269, 1992.
- 43 SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepatica. **A Hora Veterinária**, Edição extra Porto Alegre, n. 1 p.13-18, jul, 1995.
- 44 SERRA-FREIRE, N.M; BORDIN, E.L.; LESSA, C.S.S. et al. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**, Edição extra nº 1 Porto Alegre, 19-21, julho, 1995.
- 45 SILVA, A. ; NAQUIRA, F.; CORDOVA, F. Lesiones hepática iniciales de la fasciolosis experimental del conejo. **Revista Med. Peruana**, [S.l.] v. 32, n.334, p.111, 1963.
- 46 SINCLAIR, K.B. Pathogenesis of *Fasciola* and other liver-flukes. **Helminth abstr.**, [S.l.], v. 36, n. 2, p115-134, 1967.
- 47 SIQUEIRA, P. A. , SERRA, O . P., ROCHA, U.F., SERRA, R. G. Fasciolose hepática em búfalo (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*) Linnaeu, 1758, no Estado de São Paulo – Brasil. **Bol. Ind. Anim.** [S.l.] p.27-28, 1970-71.
- 48 SUAZO, F.M.; HERNANDEZ, E.F.; SORIANO, G. F. Estudio epizootológico de la fascioliasis en la zona centro del Estado de Guerrero. **Técnica Pecuária en México**, [S.l.], v.27, n.1, p. 41-47, 1989.

- 49 TAYLOR, E.L. Fascioliasis and the liver flukes. *F. A. O. Agric. Stud.*, [S.l.] v.64,n.234, 1964.
- 50 UENO, HAKARU. **Aspectos biológicos da Fasciola**. In: ANAIS ... Campo Grande, 1979, p.145-148.