

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

GLOMERULONEFRITE NA FASCIULOSE BOVINA E BUBALINA

Sandra Márcia Tietz Marques

**Porto Alegre
2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

GLOMERULONEFRITE NA FASCIULOSE BOVINA E BUBALINA

**AUTOR: Sandra Márcia Tietz Marques
Tese apresentada como requisito para obtenção
do grau de Doutor em Ciências Veterinárias
na área de Imunologia
Orientador: Profa. Maria Lúcia Scroferneker
Co-orientador: Profa. Maria I. A. Edelweiss**

**Porto Alegre
2002**

APROVADO POR:

Prof. Dominguita Lühers Graça ,
Membro da Banca.

Prof. Valdomiro Bellato,
Membro da Banca.

Prof. Heitor Alberto Jannke,
Membro da Banca.

AGRADECIMENTO

*“ A melhor coisa a fazer quando se está triste, é aprender alguma coisa. Essa é a única coisa que não falha nunca. Você pode ficar velho e trêmulo de corpo, pode ficar acordado de noite, escutando a desordem de suas veias, pode perder seu único amor, pode ver o mundo a sua volta devastado por lunáticos perigosos, ou saber que sua honra está sendo espezinhada nos esgotos das mentes mais abjetas. Só há uma coisa a fazer: **Aprender.***

Aprender porque é que o mundo se agita e o que é que o agita. Essa é a única coisa que a mente pode exaurir, nunca pode alienar, pela qual nunca pode ser torturado, que nunca precisa temer ou recear, que nunca poderá sonhar Ter que lamentar.

Aprender é o que você precisa. Observe quantas coisas há para aprender: Ciência pura, a única pureza que existe. Você pode aprender Química no espaço de uma vida, Astronomia no espaço de duas, História Natural em três, Literatura em seis. E, então, depois que gastou um milhão de vidas aprendendo Biologia e Medicina e Crítica Teológica e Geografia e História e Economia, ora, você pode começar a aprender a vencer seu adversário na esgrima.

Depois disso você pode começar de novo em matemática, até que chegue a hora de aprender a ARAR.” (MERLIN)

Roberto e Letícia Marques, esposo e filha; Catarina, Harlei e Solange Tietz, mãe e irmãos; Prof. Dr. Maria Lúcia Scroferneker, orientadora; Prof. Dr. Maria Isabel Edelweiss, co-orientadora; Prof. Laerte Ferreiro; Prof. Günter Gehlen; Carmen, Verinha, Andéia e Simone, secretárias do PPGVET; Jorge, Neiva e Flavinha, técnicos de laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Glades Pinheiro da Silva e Paulo Jerônimo de Oliveira.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE ANEXOS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. O Parasito	16
2.2. Prevalência da fasciolose em bovinos e búfalos.....	18
2.3. Patogênese da fasciolose e correlação com doença renal.....	24
2.4. Glomerulopatias parasitárias mediadas por complexos imunes	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Locais de execução	32
3.2. Material.....	32
3.3 . Métodos	38
4. ARTIGO 1	48
5. ARTIGO 2	61
6. ARTIGO 3	70
7. ARTIGO 4	96
8. DISCUSSÃO FINAL	124
9. CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS.....	127

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** *Fasciola hepatica* adulta coletada de fígado bovino abatido em frigorífico, m Viamão, Rio Grande do Sul..... 18
- FIGURA 2.** Glomerulonefrite membranoproliferativa.Bovino.1000 X. PAS. 91
- FIGURA 3.** Glomerulonefrite membranoproliferativa. Fibrose tubular.Bovino. 400X. PAS 91
- FIGURA 4.** Glomerulonefrite membranoproliferativa.Bovino. 400 X. Tricrômico de Masson. 92
- FIGURA 5.** Glomerulonefrite membranoproliferativa.Fibrose intersticial.Bovino. 200 X. Tricrômico de Masson..... 92
- FIGURA 6.** Proliferação de células mesangiais e engrossamento da matriz mesangial. Infiltrado inflamatório periglomerular e áreas de fibrose. Bovino.400 X. Tricrômico de Masson..... 93
- FIGURA 7.** Imunofluorescência em biópsia renal de bovino.Depósitos granulares epseudolineares de IgG nas áreas mesangiais e na parede capilar glomerular. 400 X. 93
- FIGURA 8.** Imunofluorescência em biópsia renal de bovino.Depósitos de IgG granular e pseudolinear nas áreas mesangiais e ao longo da parede capilar glomerular. 400 X. 94
- FIGURA 9.** Imunofluorescência em biópsia renal de bovino. Depósitos granulares e pseudolineares de IgG no glomérulo. 200 X..... 94
- FIGURA 10.** Imunoistoquímica em biópsia renal de bovino. Reação negativa. 200 X..... 95
- FIGURA 11.** Imunoistoquímica em biópsia renal de bovino. Reação positiva com antígeno de cor marrom no glomérulo. 1000 X 95
- FIGURA 12.** Imunoistoquímica em biópsia renal de bovino. Infiltrado inflamatório focal intersticial. 400 X 96

FIGURA 13. Imunoistoquímica em corte histológico de <i>Fasciola hepatica</i> . Antígenos parasitários de cor marrom. 400 X	96
FIGURA 14. Glomerulonefrite mesangioproliferativa. Búfalo. 1000 X. H & E... 119	119
FIGURA 15. Glomerulonefrite membranoproliferativa. Fibrose tubular. Búfalo. 400 X. PAS	119
FIGURA 16. Glomerulonefrite mesangioproliferativa. Lobulação do tufo glomerular. Búfalo. 400 X. PAS.....	120
FIGURA 17. Glomerulonefrite membranoproliferativa. Búfalo. 1000 X. PAS	120
FIGURA 18. Imunofluorescência em biópsia renal de búfalo. Glomérulos marcados com IgG. 100 X.....	121
FIGURA 19. Imunofluorescência em biópsia renal de búfalo. Depósitos granulares e pseudolineares de IgG glomerular. 400 X.....	121
FIGURA 20. Imunofluorescência em biópsia renal de búfalo. Depósitos mesangiais e segmentares de IgG no glomérulo. 400 X.....	122
FIGURA 21. Imunofluorescência em biópsia renal de búfalo. Depósitos mesangiais e pseudolinear de IgG no glomérulo. 400 X	122
FIGURA 22. Imunoistoquímica em biópsia renal de búfalo. Reação negativa. 1000X.....	123
FIGURA 23. Imunoistoquímica em biópsia renal de búfalo. Reação positiva. Antígeno de <i>Fasciola hepatica</i> de cor marrom no tufo glomerular. 1000 X.....	123
FIGURA 24. Glomérulo de búfalo com forma atípica . 400 X.....	124

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 01 – Artigo científico – submetido:** *Fasciola hepatica*: Prevalence of bovine fascioliasis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology. EXPR 2002-0033**..... 145
- ANEXO 02 – Artigo científico – submetido:** Glomerulonephritis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) naturally infected by *Fasciola hepatica* . **Veterinary Parasitology. VETPAR#LM058**..... 148
- ANEXO 03 – Resumo submetido:** Prevalência de fasciolose bovina no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia. 1 a 5 de Setembro de 2002. Rio de Janeiro, Brasil.** 150
- ANEXO 04 – Resumo submetido:** Fasciolose em búfalos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia. 1 a 5 de Setembro de 2002. Rio de Janeiro, Brasil**..... 152
- ANEXO 05 – Resumo submetido:** Patologia renal em bovinos infectados naturalmente por *Fasciola hepatica* . **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 1 a 5 de Setembro de 2002. Rio de Janeiro, Brasil** 154
- ANEXO 06 – Resumo submetido:** Glomerulonefrite em búfalos (*Bubalus bubalis*) infectados naturalmente por *Fasciola hepatica* . **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 1 a 5 de Setembro de 2002. Rio de Janeiro, Brasil**..... 156

RESUMO

A fasciolose é uma zoonose parasitária de importância econômica principalmente para ruminantes. O dano causado pela morte dos animais é só uma fração das perdas econômicas, que é produzido pelos estados subclínico e crônico, que se manifesta com redução na produção de carne, leite e lã, condenação de fígados parasitados, infecções secundárias por bactérias, interferências na fertilidade e gastos com tratamento.

O envolvimento de complexo antígeno-anticorpo causando reação de hipersensibilidade tipo III, decorrente de parasitoses é bem documentado. Porém não existem relatos do dano renal associado à *Fasciola hepatica*. Esta tese apresenta a comprovação da hipótese de glomerulonefrite associada à complexos imunes, em bovinos e búfalos naturalmente infectados. Foi necessária a obtenção dos parasitos para a produção de antígenos e de soro hiperimune, e de biópsias renais para a verificação *in situ* da reação antígeno – anticorpo.

Esta tese consta de quatro artigos que descrevem estudos sobre a prevalência de fasciolose em bovinos e búfalos e os diagnósticos histopatológico e imunológico para evidenciação da reação de hipersensibilidade tipo III nos rins dos animais parasitados.

O Artigo um descreve a prevalência de fasciolose em 10,34 % (39) dos 377 fígados bovinos, obtidos de animais de 11 municípios do estado do Rio Grande do Sul. Dos municípios incluídos no estudo, em 63,9 % (7) deles houve o registro do parasito.

O Artigo dois relata a prevalência de 20 % (21) de fasciolose hepática em 105 búfalos procedentes do estado do Rio Grande do Sul. Dos 5 municípios incluídos no estudo, em 80 % (4) deles houve o registro do parasito. Por faixa etária, para os búfalos de até 2 anos de idade a prevalência foi de 81 %. Para os animais acima de 2 anos de idade, a prevalência foi de 19 %.

O Artigo três relata o diagnóstico histopatológico e imunológico, através de biópsias renais de 51 bovinos, 27 infectados e 24 animais controle. As biópsias foram examinadas por microscopia óptica, imunofluorescência direta e indireta e imunohistoquímica. Os fragmentos renais corados por Hematoxilina e Eosina (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Tricrômico de Masson (TV) revelaram glomerulonefrite mesangioproliferativa (33,3 %) e glomerulonefrite membranoproliferativa (44,5 %) nos animais infectados por *Fasciola hepatica*. Através da técnica de imunofluorescência direta, 100 % das biópsias renais demonstraram depósitos granular e pseudolinear de IgG, enquanto que 70,4 % (19 animais) tiveram este diagnóstico por imunofluorescência indireta. Pela análise imunohistoquímica, o antígeno foi evidenciado em 20 bovinos parasitados. Concluiu-se que a glomerulopatia associada à fasciolose em bovinos naturalmente infectados é o modelo de injúria renal relacionado com complexos imunes.

O Artigo quatro descreve o diagnóstico histopatológico e imunológico da glomerulonefrite associada à fasciolose bubalina. Biópsias renais de 20 búfalos, 11 parasitados e 9 animais controle, foram examinadas por microscopia óptica, imunofluorescência e imunohistoquímica. Biópsias de 7 (63,3%) búfalos parasitados, revelaram glomerulonefrite membranoproliferativa, 3 biópsias (27,3 %) mostraram glomerulonefrite mesangioproliferativa. A imunofluorescência revelou depósitos de padrão granular e pseudolinear de IgG e análise imunohistoquímica revelou a presença de antígenos de *Fasciola hepatica* nos glomérulos. Do grupo controle, biópsias de 7 búfalos (77,8 %) não apresentaram alteração histopatológica e imunológica, enquanto biópsias de 2 búfalos (22,2 %) revelaram glomerulonefrite, entretanto com resultados negativos para as provas imunológicas. Concluiu-se pela correlação da glomerulonefrite com fasciolose em búfalos, sendo os resultados discutidos no presente trabalho.

ABSTRACT

Fascioliasis is an economically important parasitic zoonosis that mostly affects ruminants. The subclinical and chronic states of the disease cause economic loss through decreased meat, milk and wool yields, liver condemnation, secondary bacterial infections, fertility disorders and treatment expenses.

The involvement of the antigen-antibody complex in parasitic diseases, producing hypersensitivity type III, has been well-documented in the literature. However, there are no reports on the renal injury caused by Fasciola hepatica. The present thesis confirms the hypothesis of glomerulonephritis associated with immune complexes in naturally infected cattle and buffaloes. Parasites were obtained for the production of antigens and hyperimmune serum, and kidney biopsies were used for the in situ confirmation of the antigen-antibody reaction.

This thesis consists of four articles on the prevalence of fascioliasis in cattle and buffaloes, showing the histopathological and immunological analyses used to confirm hypersensitivity type III reaction in the kidneys of infected animals.

The first article reports the prevalence of fascioliasis in 10.34% (39) of 377 bovine livers obtained from animals of 11 counties in the State of Rio Grande do Sul. Fasciola hepatica was found in 63.9% (7) of these counties..

The second article shows a 20% prevalence of fascioliasis among 105 buffaloes from the State of Rio Grande do Sul. The parasite was detected in four out five counties included in the study. In terms of age, the prevalence rate was 81% for buffaloes with up to two years of life and 19% for buffaloes older than two years.

In the third article, kidney specimens of 51 animals, 27 with fascioliasis and 24 uninfected animals (controls), were examined by light microscopy, direct and

indirect immunofluorescence, and immunohistochemical analysis. The sections stained with hematoxylin and eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS) and Masson's trichrome revealed mesangioproliferative glomerulonephritis (33.3%) and membranoproliferative glomerulonephritis (44.5%) in animals infected by Fasciola hepatica. On direct immunofluorescence, 100% of the animals with fascioliasis had granular and pseudolinear IgG deposits; while 70.4% (19 animals) had this diagnosis on indirect immunofluorescence. On the immunohistochemical assay, however, the Fasciola hepatica antigen was found in 20 infected animals. It is concluded that glomerulopathy is associated with fascioliasis and that buffaloes are suitable as a naturally existent experimental model of renal injury by circulating immune complexes.

The fourth article describes the histopathological and immunological diagnosis of glomerulonephritis associated with fascioliasis in buffaloes. Renal biopsies of 20 buffaloes, 11 with Fasciola hepatica and nine uninfected buffaloes (controls), were examined by light microscopy, direct and indirect immunofluorescence, and immunohistochemical analysis. The biopsies of seven (63.3%) infected buffaloes revealed membranoproliferative glomerulonephritis, three biopsies (27.3%) showed mesangioproliferative glomerulonephritis. Immunofluorescence detected patterns of granular and pseudolinear IgG deposits, while the immunohistochemical assay showed Fasciola hepatica antigens in the glomeruli. In the control group, seven buffaloes (77.8%) presented normal biopsy specimens, while two (22.2 %) revealed glomerulonephritis; however, the results of immunological tests were negative. Our conclusion is that glomerulopathy is associated with fascioliasis in buffaloes, as shown by the results discussed in the present thesis.

1. INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma zoonose parasitária de importância econômica principalmente para ruminantes. Caprinos, eqüinos, suínos e muitas espécies de herbívoros podem também serem infectados, porém o parasito é de menor importância em escala global nestes hospedeiros (Torgenson e Claxton, 1999).

O homem também é hospedeiro susceptível e, em algumas áreas do mundo, a fasciolose humana tem caráter epidêmico e é considerada zoonose emergente (Mas-Coma *et al.*, 1999).

No Brasil, a fasciolose em bovinos e bubalinos foi detectada nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Goiás, através de diagnóstico clínico, coprológico, sorológico e por necropsia (Ueno *et al.*, 1982; Amato *et al.*, 1986; Serra-Freire *et al.*, 1995; Serra-Freire, 1995; Pille *et al.*, 1999; Serra-Freire e Nuernberg, 1992; Araújo *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1999).

Os danos causados pela morte dos animais parasitados são só uma fração das perdas econômicas, que são produzidos pelos estados subclínico e crônico, que se manifestam com redução na produção de carne, leite e lã, condenação de fígados parasitados, infecções secundárias por bactérias, interferência na fertilidade e gastos com tratamento (Hatschback, 1995; Cordova *et al.*, 1997).

A fasciolose consiste em infecção do fígado com formação de lesões necróticas e fibrosas, hipertrofia dos canalículos biliares, necrose dos lóbulos hepáticos, distensão da cápsula hepática, colecistite, litíase e cirrose. Na fase aguda, os animais apresentam febre, eosinofilia, aumento doloroso do fígado, leucocitose e diarreia. Na fase crônica, ocorre dor abdominal, diarreia, hepatomegalia, eosinofilia,

anemia, perda de peso e complicações da cirrose. Estas manifestações dependem do número de metacercárias ingeridas e da resistência dos animais (Soulsby, 1982; Acha e Szyfres, 1986; Urquhart *et al.*, 1987; Acosta, 1994; Aloaechea, 1994 e Mulcahy *et al.*, 1999).

O diagnóstico da fasciolose baseado na detecção de ovos nas fezes, na fase aguda da doença não é possível, ocorrendo, entretanto, após 8 a 10 semanas de infecção, quando o parasito adulto começa a liberar os ovos.

Portanto, métodos diagnósticos mais precoces, sensíveis e específicos se tornaram necessários, possibilitando contribuir para o controle, tratamento ou erradicação da fasciolose. O diagnóstico sorológico demonstra eosinofilia, leucocitose e anemia, sugestivos da infecção por *Fasciola hepatica*. Imunodiagnóstico, através da detecção de anticorpo e antígeno são utilizados preferencialmente (Duffus e Franks, 1980).

O parasitismo caracteriza-se por uma situação na qual o parasito possui uma relação de dependência metabólica de grau variável com seu hospedeiro, e as conseqüências patológicas das parasitoses são decorrentes da maneira como o sistema imune do hospedeiro reage à infecção e não somente aos efeitos deletérios diretos da ação dos parasitos.

Em algumas infecções parasitárias formam-se complexos imunes que podem se depositar nos glomérulos, causando muitas vezes reações irreversíveis. Este tipo de reação pode ocorrer na malária, na hidatidose, esquistossomose, leishmaníase, doença de Chagas, elefantíase, loíase e dirofilariose.

A persistência de antígenos por uma infecção continuada pode levar à doença por complexo imune. O dano mediado pelo complemento e por células imunes efetoras é conhecido por reação de hipersensibilidade tipo III. Os locais afetados pela deposição destes complexos são parcialmente determinados pela localização do antígeno nos tecidos e também pela maneira como estes complexos imunes circulantes tornam-se depositados (Roitt *et al.*,1997).

Um dos eventos mais importantes para a deposição dos complexos imunes nos tecidos é o aumento da permeabilidade vascular. Este processo pode ser iniciado por uma gama de mecanismos, dependendo da doença e da espécie animal, onde atuam o complemento, mastócitos, basófilos e plaquetas que são produtores

potenciais de aminas vasoativas. Outro evento de importância para a deposição de complexos imunes é a permeabilidade destas moléculas em se depositarem nos capilares glomerulares, onde a pressão sanguínea é maior.

O antígeno, no complexo, também determina a especificidade por determinado órgão, como ocorre nas glomerulonefrites imunomediadas, que acompanham muitas parasitoses. O tamanho do complexo imune formado também define o local de destino (Confer e Panciera, 1998).

Carvalho *et al.* (1983) e Andrade e Van Marck (1984) relataram a presença de complexos imunes circulantes em bovinos com fasciolose, afirmando que estes complexos são importantes para o diagnóstico e que a detecção de anticorpos pode dar maior clareza da interação hospedeiro-parasito.

Considerando a inexistência de pesquisas que contemplem a reação de hipersensibilidade tipo III decorrente da fasciolose e a demonstração do dano renal já descrito em outras parasitoses, este trabalho teve por objetivos verificar a ocorrência do dano renal em bovinos e bubalinos, naturalmente parasitados por *Fasciola hepatica*; classificar as lesões renais através de técnicas histológicas e demonstrar a presença de complexos imunes em biópsias renais.

O presente trabalho constitui-se de quatro artigos que relatam estudos nesta linha de investigação. O artigo um descreve a prevalência de *Fasciola hepatica* em bovinos abatidos em frigorífico no Rio Grande do Sul. O artigo dois relata a prevalência da fasciolose em búfalos abatidos no Rio Grande do Sul. No artigo três, demonstra-se pela primeira vez, a presença de glomerulonefrite em bovinos naturalmente infectados, com a comprovação através de diagnósticos histopatológico e imunológico. No artigo quatro, descreve-se pela primeira vez, glomerulonefrite em búfalos naturalmente parasitados por *Fasciola hepatica*, baseado nos diagnósticos histopatológico e imunológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O parasito

A *Fasciola hepatica* (Linnaeus,1758) é classificada no Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda, Ordem Digenea e Gênero *Fasciola*. Necessita de um hospedeiro intermediário semi-aquático para completar o seu desenvolvimento. Os caramujos hospedeiros são geralmente do gênero *Limnaea*.(L.).

Várias espécies deste gênero foram determinadas, porém no Brasil as espécies presentes são a *L. columella*, *L. viatrix* e *L. cubensis* (Lutz, 1921; Santos e França, 1970; Rezende, 1979; Ueta, 1980; Souza e Rebelo, 1981; Ueno *et al.*, 1982; Paraense, 1982a, 1983, 1986; Amato *et al.* 1986; Telles *et al.*,1991; Araújo *et al.*, 1995b; Abílio e Watanabe, 1998; Souza *et al.* , 1998; Pille *et al.*,1999; Carvalho *et al.*, 2001. No Rio Grande do Sul, a *L. columella* foi identificada como hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, pela primeira vez, por Gonzales *et al.* (1971) no município de Sapucaia do Sul. Silva-Santos *et al.* (1994) a detectaram no município de Eldorado do Sul. Silva-Santos e Wender (1994) a detectaram no município de Gramado.

A *L. viatrix* foi identificada pela primeira vez em Pelotas e Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul, por Rey em 1957 ; Muller e Ueno (1982) encontraram as duas espécies infectadas por *Fasciola hepatica* em Santa Vitória do Palmar. Rezende (1979), Souza e Rebelo (1981), Gutierrez *et al.* (1982); Müller (1982), também as identificaram no Rio Grande do Sul. Paraense (1982b) relatou a presença de *L. rupestris* em Santa Catarina.

As espécies de *Limnaea* vivem principalmente em habitat alagadiços, tais como áreas pantanosas e brejos. São encontradas, via de regra, sobre a lama úmida, às vezes parcialmente enterradas, próximas às margens das águas, sobre macrófitas aquáticas ou sobre vegetais em decomposição (Paraense, 1983).

Ao penetrar nos caramujos, os miracídeos se convertem em esporocistos e em 3 semanas produzem rédias, que originam rédias filhas ou cercárias. Se a umidade e temperatura são favoráveis, as cercárias começam a emergir dos caracóis em torno de 6 semanas (Acha e Szyfres, 1986).

As cercárias, ao abandonarem o caracol, nadam ativamente na água e se encistam na vegetação ou na superfície da água, se transformando em metacercárias. Os hospedeiros definitivos se infectam ao ingerir plantas ou água com as metacercárias. No duodeno, as larvas se liberam do envoltório, atravessam a parede intestinal, perfuram a cápsula de Glisson e, através do parênquima hepático, chegam aos ductos biliares, onde amadurecem, atingindo seu completo desenvolvimento. O período pré-patente dura em torno de dois meses, porém nem todas as fascíolas jovens alcançam a maturidade ao mesmo tempo, e o processo de maturação pode se prolongar por mais dois meses. O ciclo reinicia com a ovoposição. A *Fasciola hepatica* pode viver nos canais biliares por vários anos (Soulsby, 1982; Andrews, 1999).

O parasito adulto (Figura 1) se caracteriza por apresentar, em vida, o corpo com coloração avermelhada, foliáceo achatado dorso-ventralmente, com a porção mais anterior em forma de um cone (cone cefálico) e, posteriormente, atenuando-se progressivamente, terminando em ponta romba. Mede 20 a 30 mm por 8 a 13 mm, com espessura de 2 a 3 mm. Cutícula armada com pequenas escamas espiniformes que são abundantes na parte anterior do corpo e diminuem de quantidade à medida que avançam para o final do corpo, estando ausentes na parte posterior. Ventosa oral pequena, arredondada e terminal.

Tem acetábulo ou ventosa ventral em posição mediana e um pouco maior que a ventosa oral, medindo 1,6 mm de diâmetro e estando distante da ventosa ventral cerca de 3 a 5 mm. Faringe bem desenvolvida, esôfago muito curto; cecos intestinais estendendo-se até a extremidade posterior do corpo, ramificado e os ramos mostram ramificações secundárias. Poro genital mediano, situado imediatamente

adiante do acetábulo; bolsa do cirro bem constituída; testículos profusamente ramificados, situados um adiante do outro, sem atingir a região caudal e as margens laterais do corpo. Ovário pré-testicular, muito ramificado e discretamente deslocado lateralmente; glândula de Mehlis muito desenvolvida, pré-testicular e mediana. Útero com várias circunvoluções, situadas entre o testículo anterior e o acetábulo; vitelino localizado lateralmente, profundamente ramificado, estendendo-se da região acetabular à extremidade posterior do corpo, sendo que na zona pós-testicular, ocupa toda a área do corpo. Ovos operculados, medindo 0,130 a 0,145 mm por 0,070 a 0,090 mm (Travasso *et al.* 1969 apud Serra-Freire, 1995b). A produção de ovos é extremamente rápida ou um ovo a cada 3,46 segundos (Fairweather *et al.*, 1999) e cada parasito pode produzir de 10000-30000 ovos por dia (Malone, 1986).



FIGURA 1. *Fasciola hepatica* adulta coletada de fígado bovino abatido em frigorífico, em Viamão, Rio Grande do Sul.

2.2. Prevalência da fasciolose em bovinos e bubalinos

A fasciolose tem distribuição cosmopolita. No continente africano, no Marrocos, Moukrin e Rondeland (1991) diagnosticaram prevalência de 10,4% em bovinos. Yilma e Malone (1998) relataram taxas de prevalência que variaram de 0 a 9 % até 76 a 100 % , afirmando que a *Fasciola hepatica* é a espécie mais importante

nas propriedades da Etiópia, com distribuição em 3 / 4 da nação, variando os padrões de prevalência em razão direta da região geográfica estudada.

No continente asiático e na Austrália, Bausov *et al.* (1981 apud Torgenson e Claxton, 1999) demonstraram prevalência de 30,4% em bovinos na União Soviética. Na Austrália, Baldock e Arthur (1985) diagnosticaram *Fasciola hepatica* em 1,1% de bovinos. Celeb e Ultav (1988) encontraram prevalência de 29,3% em bovinos e búfalos, na Turquia.

Anderson *et al.*, (1999) diagnosticaram 88 % de prevalência de fasciolose em fígados de bovinos abatidos em Hanoi. Em 2000, Holland *et al.*, diagnosticaram 22% de fasciolose em bovinos, por exame de fezes, no Vietnã.

Na Malásia, Salcha (1991) relatou a presença de *Fasciola hepatica* somente em bovinos e búfalos importados, com taxas de infecção que variaram de 14,7 % no período de 1971 a 1976; 73,8 % no quinquênio 1975-1979; 88,7 % no biênio 1978-1979 e de 41,7 % no ano de 1981.

Na China, Gu *et al.* (1998 apud Jiang *et al.*, 2000) constataram prevalência de 53 % em búfalos das águas em várias cidades junto ao rio Yan thzee.

Genicot *et al.* (1991) demonstraram prevalência de 12,5% em bovinos tipo carne, na Bélgica.

Na Alemanha, Simmank (1987 apud Torgenson e Claxton, 1999) encontrou prevalência de 10,7% em bovinos ; Wacker *et al.* (1999) detectaram fasciolose em 80 % das propriedades investigadas no leste da Alemanha, com prevalência estimada de 1 a 20 % para novilhas bovinas.

Dados do Departamento de Agricultura da Irlanda mostraram prevalência de 45% em bovinos (Torgenson e Claxton, 1999).

Na região italiana de Trento, Poglayer *et al.* (1995) demonstraram prevalência de 5% em bovinos.

Konopka (1993 apud Torgenson e Claxton, 1999) diagnosticou fasciolose em 7,2% dos bovinos pesquisados na Polônia. Na Espanha, González-Lanza *et al.* (1989) verificaram prevalência de 29,5% de bovinos parasitados. No Reino Unido, a prevalência registrada foi de 10% em bovinos (Taylor, 1989 apud Torgenson e Claxton, 1999).

Na Inglaterra, Froyd (1975) pesquisou a fasciolose em 8239 fazendas , com prevalência de 53 % de fígados de bovinos parasitados.

Levantamento epidemiológico realizado em Quebec, no Canadá, mostrou taxa de prevalência acima de 68% em vacas de leite (Bouvry e Rau, 1986).

Malone relatou prevalência de infecção de 3 a 4 % de todos os bovinos abatidos nos Estados Unidos, no ano de 1986, com condenação de 1 a 1,5 milhões de fígados distomatosos.

Nos Estados Unidos da América, as taxas de prevalência em gado de corte variaram de 5,9% até 68%, nos estados da Califórnia, Colorado, Idaho, Nebraska, Texas, Flórida e Montana (Knapp *et al.*, 1992; Briskey *et al.*, 1994; Kaplan, 1994).

Bundy *et al.* (1984) demonstraram prevalência de 22,2% em bovinos na Jamaica.

Gómez (1984), no México, determinou a freqüência de 24,2 % de pulmões parasitados por *Fasciola hepatica* em bovinos.

No México, Encinas-García *et al.* (1989) detectaram prevalência de 5,2% de fasciolose em bovinos; Ramos *et al.* (1993) investigaram a freqüência de fasciolose em touros, através da visualização dos parasitos no fígado (25,6 %); da presença de ovos na bile (28,2%) e nas fezes (69,2%). Este experimento se referiu aos anos de 1987-1988.

Durante a temporada dos touros, em 1986-1987, Garcia (apud Ramos *et al.*, 1993) verificou a freqüência de 40% de ovos de *Fasciola hepatica* através de exame parasitológico. Suazo *et al.* (1989) detectaram, no México, 13,8 % de fasciolose pela constatação do parasito adulto e 16,6 % por exame parasitológico em bovinos. Hurtado *et al.* (1992) relataram taxa média de 7,31 % (de 0,15 % até 18,31%) de fígados condenados por fasciolose, durante os anos de 1979 a 1987, no México.

Suárez *et al.* (1993) avaliaram através de exame parasitológico, fezes de bovinos de 25 propriedades em nove municípios mexicanos. Constataram prevalência total de 17,71% com percentuais oscilando entre zero e 100% de ovos de *F. hepatica* presentes nas fezes.

Ruiz e Duran (1994) avaliaram a fasciolose bovina através da presença do parasito no fígado e a prevalência por municípios mexicanos, onde 19,7 % dos fígados foram condenados e a incidência da infecção variou de 5 até 42,2 %. No

Chile, Alcaíno (1985) relatou prevalência acima de 94% em bovinos. Morales *et al.* (2000) verificaram a distribuição e tendência da fasciolose em bovinos, no período de 1989 a 1995. Constataram taxa de 30,1 % em bovinos e tendência a ampliação desta parasitose no Chile. Dwinger *et al.* (1982), inspecionando fígados de bovinos de corte, na região noroestes da Argentina, encontraram lesões por fasciolose em 13 % dos fígados.

Na Venezuela, Perruolo *et al.* (1987) relataram prevalência de 8,48 % de fasciolose em matadouro. Através de exame parasitológico a prevalência foi de 0,85 %.

No Peru, Leguía *et al.* (1989 apud Torgenson e Claxton, 1999) demonstraram prevalência de 29 % de fasciolose em bovinos.

Claxton *et al.* (1997) relataram a prevalência de 78 % de fasciolose em gado de leite na região de Cajamarca, maior produtor de leite do Peru.

Mauri e Alonso (1989) , em Havana, Cuba, através de diagnóstico parasitológico, verificaram prevalência de 7,2 % das amostras estudadas nos anos de 1978 até 1984.

No biênio 1978-1979, as prevalências foram, respectivamente, de 14,8 % e 15,2 %, as taxas mais altas encontradas; foram de 4 e 3,9 %, respectivamente, nos anos de 1980 e 1981, as prevalências mais baixas registradas.

No Uruguai, Nari e Cardozo (1996) relataram prevalência de 57 % de fasciolose em bovinos.

2.2.1. Fasciolose hepática no Brasil

Lutz, em 1921, identificou pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro *Fasciola hepatica*. Pêcego (1926), citado por Serra-Freire (1995b) avaliou prevalência da fasciolose em matadouro, para um período de oito anos, obtendo taxa de infecção de 0,34 a 10,4 %.

No Rio Grande do Sul, Oliveira (1932) citado por Serra-Freire (1995b), determinou prevalência de 11,8 % para bovinos.

Pinto e Almeida (1935) registraram 0,08 a 18,8 % de fasciolose em bovinos. Rey (1958) relatou prevalência de 2,24 %, enquanto Corrêa (1965 apud Serra-

Freire,1995b) informou índices de fasciolose em bovinos de 4,78 %, para o ano de 1958; e de 5,74 % para o ano de 1959; de 2,57 % para o ano de 1960; de 5,14 % para o ano de 1961; de 13,84 % para o ano de 1962 e 13,27 % para o ano de 1963.

No estado de São Paulo, França (1967) verificou 10,1 % de fasciolose em bovinos, pelo exame de fígados de matadouro.

Silva *et al.*(1980) relataram a prevalência de 27,2 % de fígados distomatosos de bovinos abatidos no Rio Grande do Sul, no ano de 1978.

No município de Piquete, em São Paulo, Amato *et al.*(apud Serra-Freire,1995b) registraram, para o ano de 1982, 80% de fasciolose, através de exames parasitológicos de bovinos. Oba *et al.* relataram o parasitismo em 50 % dos bovinos no município paulista de Santana do Paraíba, no ano de 1983. Para os municípios de Lorena e Piquete, Serra-Freire *et al.* (1980) verificaram taxa de prevalência de 80 até 100 %; Pile (1990) comprovou variação de 26,6 a 50,4 % para bovinos do município paulista de Redenção da Serra.

Ueno *et al.*(1982) diagnosticaram *Fasciola hepatica* em fígados de bovinos abatidos em frigoríficos no estado do Rio Grande do Sul.

Em 1983, no estado do Rio de Janeiro, Nuernberg *et al.* assinalaram prevalência de 35,8 % para bovinos procedentes de Três Rios (Serra-Freire, 1995).

Silva-Santos (1987) avaliou fígados bovinos da Estação Experimental Zootécnica de Dom Pedrito (RS), constatando 9,61 % de fasciolose aguda, 82,69 % de fasciolose crônica e 3,85% de fasciolose crônica e hidatidose.

Em Santa Catarina, Beck (1985) realizou levantamento epidemiológico da fasciolose bovina no período de 1980 a 1981, nas regiões do Vale do Itajaí e Litoral Catarinense. Através de exames de fezes, a fasciolose prevaleceu em 100 % dos 19 municípios analisados, em 91,5 % das 82 propriedades avaliadas e em 46 % dos 770 animais amostrados. Par este estado, Serra-Freire e Nuernberg (1992), investigaram esta parasitose em 129 municípios (64,82 %). O período de janeiro de 1977 a dezembro de 1988 mostrou prevalência de 27,86 % em bovinos e de 24,72 % de búfalos, permitindo afirmar a presença de áreas endêmicas para a fasciolose em ruminantes.

Serra-Freire *et al.* (1995) investigaram a distribuição da fasciolose bovina em 904 propriedades, no período de maio de 1994 a janeiro de 1995. Das

propriedades envolvidas, 25 % eram positivas. A prevalência de animais positivos foi de 6,3 % no Rio Grande do Sul; 15 % em Santa Catarina, 6,7 % em São Paulo, 13 % no Rio de Janeiro e 2 % em Minas Gerais. Araújo *et al.* (1995a) identificou *Fasciola hepatica* nos ductos biliares de bovinos abatidos em matadouro, no município de Santa Helena, estado de Goiás.

Echevarria (1995) relatou que, pelos anos de 1985, o nível de condenação de fígados distomatosos era de 35 a 40 % na fronteira do Rio Grande do Sul. Os níveis foram reduzindo para 10 a 11 % até os anos de 1991-1992. Logo a seguir, estes níveis aumentaram para 20 a 25 % e a taxa de condenação de fígados estaria em torno de 15 %.

Scherer *et al.* (1995) investigaram 67 propriedades na Região dos Lagos (Rio de Janeiro) e, por exame parasitológico relataram a ocorrência de *Fasciola hepatica* em 6 % dos bovinos nascidos e criados nesta região.

Bruno *et al.* (1995) registraram, pela primeira vez, a ocorrência de fasciolose com prevalência de 58,9 % em bovinos, no município de Macacu, Rio de Janeiro.

Historicamente, a fasciolose na Europa tem aspecto cíclico, com picos epizooticos. Comparativamente, no Brasil, até o início da década de 80, acreditava-se que não estavam acontecendo grandes mudanças deste típico comportamento europeu, e a prevalência geral era mais baixa do que em outras áreas do mundo. No início da década de 90 tinha-se conhecimento de que a fasciolose, no Vale do Paraíba, vem mantendo prevalência variável de 40 a 100%, em média para as propriedades de produção leiteira; também foram registrados os mais altos índices de parasitismo natural da *L. columella*. por *Fasciola hepática*, chegando aos 20 a 25% (Serra-Freire, 1995b).

Muller *et al.* (1997) realizaram levantamento sobre a fasciolose bovina junto ao Serviço de Inspeção nos frigoríficos da Região Sul do Rio Grande do Sul, para o período de maio de 1993 a maio de 1997. Os dados mostraram prevalência de 13,2%. Destacaram-se os municípios de Santa Vitória do Palmar (38%); Cristal (37,8%); Camaquã e Herval (19%). Nos municípios de Bagé, Dom Pedrito, São Lourenço do Sul, Rio Grande, Arroio Grande, Tapes, Hulha Negra, Pinheiro Machado, Canguçu, Encruzilhada do Sul, Caçapava do Sul, Candiota, Lavras do Sul, Amaral Ferrador e Cruz Alta, a prevalência variou de 10 a 15%.

Silva *et al.*,(1980) relataram a prevalência de 27,2% de fígados distomatosos de bovinos abatidos no Rio Grande do Sul, no ano de 1978.

Luz *et al.*(1992,1999) e Neto *et al.* (1999) registraram prevalência média de fasciolose de 45 % de bovinos na área metropolitana de Curitiba, estado do Paraná.

Santos *et al.*(1999) verificaram a ocorrência de 55,5% de fasciolose por exame parasitológico, em carneiros de 18 municípios da Grande Porto Alegre, RS.

2.3 Patogênese da fasciolose e correlação com doença renal.

As lesões essenciais induzidas pela *Fasciola hepatica* ocorrem no fígado e são produzidas pela larva migratória e pelo parasito adulto nos ductos biliares. Entretanto, estes dois tipos de lesão freqüentemente ocorrem ao mesmo tempo. A incidência adicional de peritonite é produzida pelas formas jovens, quando de sua passagem pelo fígado. Acidentalmente, entram nas veias hepáticas e circulação sistêmica, para se localizarem em sítios erráticos, formando nódulos sobre a pleura e abscessos encapsulados nas porções finais dos brônquios, porém, os parasitos são muito pequenos e difíceis de serem encontrados por inspeção macroscópica. Com infecções maciças e repetitivas, ocorre peritonite aguda e exsudativa ou crônica e proliferativa. Nos casos agudos, os depósitos fibrino-hemorrágicos ocorrem nas superfícies serosas e nos casos crônicos evidenciam-se placas fibrosas com adesão difusa pelo tecido conetivo (Jubb *et al.*, 1993).

Lesões pulmonares são encontradas em muitos infectados, e pneumonia, pleurite fibrosante e fluido pleural são comumente descritos, com patologia mais significativa em infecções maciças (Boray,1969; Acha e Szyfres,1986; Suano *et al.*, 1989; Hawn e Jong, 1999; Fabre *et al.*, 2001).

Dados obtidos no Frigorífico CICADE (Bagé, RS) em 1979, informaram que 5,2 % dos bovinos abatidos (237) apresentaram fasciolose pulmonar, com formação de nódulos císticos, em níveis sub-pleurais do parênquima e mais raramente nos brônquios. Estes cistos mediam ,aproximadamente, 1cm de diâmetro e freqüentemente continham mais de um parasito adulto, ocorrendo, por vezes, a formação de fístulas, pelas quais os ovos do parasito escoam e atingem o lúmen

bronquiolar. Nesses cistos podem ser observados somente parasitos mortos ou ovos envolvidos por reação fibrosa (Bordin, 1995; Mecusen, 1999).

Gómez (1984) diagnosticou prevalência de 24,2% de pulmões bovinos parasitados.

Órgãos como o útero, medula espinhal e tecido subcutâneo são alvo da migração do parasito em bovinos (Programa Estadual de Controle da Fasciolose/RS, 1996).

As lesões agudas no fígado são basicamente traumáticas, ocorrendo focos hemorrágicos e necrose. Em infecções maciças pode ocorrer a fusão entre eles e com áreas portais hepáticas dando origem à fibrose. Parte das fasciolas jovens pode se encistar no parênquima hepático, consistindo estes cistos de uma cápsula de tecido conetivo, presença de sangue, detritos e excrementos do trematódeo. Os cistos podem se tornar mineralizados e, ao exame do fígado à inspeção, chama à atenção quando a faca executa os cortes necessários à liberação ou não deste fígado para o consumo humano (Jubb *et al.*, 1993).

Existe uma considerável variação nas taxas de infecção e severidade da doença entre os animais bovinos e bubalinos. Arterite é característica na infecção e a fibrose é marcante. Os parasitos estão concentrados na porção ventral do fígado. Muitas fasciolas ficam presas no parênquima e, com altos níveis de infecção somente cerca de 5 % alcançam os ductos biliares (Ross, 1965 apud Behm e Sangster, 1999). As fasciolas sobreviventes se confrontam com uma reação inflamatória hostil. Os ductos biliares engrossam devido à hipertrofia epitelial e fibrose da parede do ducto. Depósitos de cálcio começam a se formar nas paredes dos ductos após 16 a 20 semanas de infecção. Os ductos engrossam e se tornam proeminentes na superfície do fígado, variavelmente dilatados, estenosados e o epitélio mostra ulceração e hemorragia, quadro típico de colangiohepatite (Doyle, 1987; Jubb *et al.*, 1993; Tanimoto *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1999).

Este quadro patológico ocorre em todos os lobos hepáticos mas é usualmente mais severo no lobo esquerdo, sendo que o lobo direito se torna, por compensação, hipertrofiado em grau moderado (Malone, 1986; Jubb *et al.*, 1993).

Com base em trabalhos de Ross *et al.* (1967), Sinclair (1967), Dow *et al.* (1968), Boray (1969), Barnóuin *et al.* (1982), Reinecke (1983), Malone (1986),

Urquhart *et al.*(1987), Srihakim e Pholpark (1991), McCole *et al.* (1998), Yang *et al.* (1998), Behn e Sangster (1999), Yadav *et al.*(1999), Fyffe (1999), Jiang *et al.* (2000), Bossaert *et al.* (2000), a patologia e a sintomatologia da fasciolose em ruminantes por semanas pós-infecção (p.i.) ficam assim distribuídas:

- 1 a 3 semanas p.i., os efeitos clínicos são pouco evidentes, o exame de sangue não apresenta alterações e não há a presença de ovos nas fezes;
- 4 a 5 semanas p.i. , com poucos efeitos clínicos, aparecimento ou não de eosinofilia e hiperglobulinemia. Não há presença de ovos nas fezes;
- 6 a 8 semanas p.i., fasciolose aguda tipo I e morte do animal por infecção com mais de 10000 metacercárias. Ocorre ascite, hemorragia abdominal, icterícia, palidez de membranas e fraqueza. Diagnostica-se anemia, hipoalbumemia e eosinofilia. Não há presença de ovos nas fezes;
- 9 a 11 semanas p.i., fasciolose aguda tipo II, com anemia, hipoglobulinemia e eosinofilia. Os ovos podem aparecer nas fezes.
- 12 a 40 semanas p.i., são descritas a fasciolose subaguda e a fasciolose crônica, com resultados hematológicos mostrando anemia normocrômica ou normocítica, hipoalbuminemia, atividade elevada das enzimas hepáticas e eosinofilia. Presença de ovos nas fezes.

Parasitas podem causar morbidade, não somente através dos efeitos locais mas também através de efeitos sistêmicos. O rim é um órgão altamente vascularizado e não é surpresa que ele pode estar envolvido em doenças parasitárias.

Várias formas de lesão glomerular são descritas em infecções parasitárias e o mecanismo imune tem um papel importante na sua patogênese (Churg *et al.*, 1995).

Após a exposição do hospedeiro ao antígeno do parasito, o animal responde sintetizando anticorpos, posteriormente interagindo com o antígeno, formando complexos imunes, neutralizando e eliminando o antígeno. Entretanto, sob certas circunstâncias, a formação de complexos imunes não beneficia o hospedeiro. Von Piquet (1911) apud Theofilopoulos e Dixon (1979) foi o primeiro a sugerir efeitos lesivos ao organismo causados pela interação antígeno-anticorpo. Nos anos seguintes, outros pesquisadores os confirmaram, quando induziram, experimentalmente, a doença do soro em coelhos, com glomerulonefrite e vasculite generalizada, coincidindo com o aparecimento de complexos imunes solúveis

circulantes, decréscimo da atividade do complemento e deposição de complexos imunes nos rins (Cattell e Jennette, 1998).

A persistência de antígenos por uma infecção continuada pode levar à doença por complexo imune. O dano mediado pelo complemento e por células imunes efetoras é conhecido por reação de hipersensibilidade tipo III. Os locais afetados pela deposição de complexos imunes são parcialmente determinados pela localização do antígeno nos tecidos e também pela maneira como estes complexos circulantes tornam-se depositados (Roitt *et al.*, 1997).

Um dos eventos mais importantes na deposição dos complexos imunes nos tecidos é o aumento da permeabilidade vascular. Este processo pode ser iniciado por uma gama de mecanismos, dependendo da doença e da espécie animal. Atuam o complemento, mastócitos, basófilos e plaquetas, que são produtores potenciais de aminas vasoativas (Barnett, 1986; Bagchus *et al.*, 1986; Quigg *et al.*, 1998).

O antígeno, no complexo antígeno-anticorpo, determina a especificidade por determinado órgão, como ocorre nas glomerulonefrites que acompanham parasitoses como malária, hidatidose, leishmaníase, esquistossomose e doença de Chagas, entre outras.

A glomerulonefrite por complexo imune é iniciada pela formação de complexos solúveis na presença de níveis séricos com equivalência de antígeno-anticorpo ou com leve excesso de antígeno. Estes complexos são seletivamente depositados nos capilares glomerulares, estimulando a fixação de complemento, com formação de C3a, C5a e C567, que são quimiotáticos para neutrófilos. Durante os estágios iniciais, a infiltração de neutrófilos danifica a membrana basal através da liberação de enzimas hidrolíticas. Mais tarde, monócitos infiltram os glomérulos e são responsáveis pelo dano sustentado (Roitt *et al.*, 1997; Confer e Panciera; 1998; Cotran, 1999)

A carga do antígeno e do anticorpo pode ser importante para alguns sistemas, onde ambos, carregados positivamente, tem maior probabilidade de se depositarem na membrana basal glomerular carregada negativamente (Roitt *et al.*, 1997).

O tamanho do complexo imune formado também determina o local de destino, onde complexos imunes pequenos podem passar pela membrana basal

glomerular e terminar no lado epitelial da membrana, ao passo que complexos imunes grandes são incapazes de atravessarem a membrana e, geralmente, acumulam-se entre o endotélio e a membrana basal ou no mesângio (Isaacs e Miller, 1982; Roitt *et al.*, 1997; Confer e Panciera, 1998; Cotran, 1999).

Uma vez que os complexos imunes são depositados nas membranas basais dos capilares, ocorre uma série de eventos que induz à lesão glomerular e alteração da permeabilidade. A ativação da cascata do complemento resulta em geração de fatores quimiotáticos que atraem neutrófilos para o glomérulo. Os neutrófilos liberam proteinases, metabólitos de ácido aracdônico e radicais livres derivados de oxigênio, causando degradação da membrana basal glomerular. A liberação de moléculas biologicamente ativas das células mesangiais dos glomérulos, dos monócitos e dos macrófagos aumenta a lesão glomerular (Chemello *et al.*, 1998; Cattell e Jennette, 1998).

A lesão glomerular pode ocorrer na ausência de infiltração de neutrófilos, através da agregação plaquetária e ativação do fator Hageman, causando trombos de fibrina e isquemia glomerular. Adicionalmente, o dano às células glomerulares pode resultar diretamente do complexo de ataque à membrana, pela cascata ativa do complemento. Se a exposição do glomérulo aos complexos imunes for de curta duração, os complexos imunes serão fagocitados por macrófagos ou células do mesângio e removidos. Assim a lesão glomerular e os sinais clínicos se resolverão. Por outro lado, uma exposição continuada dos glomérulos a imunocomplexos solúveis pode resultar em injúria glomerular progressiva, lesões graves e doença clínica (Confer e Panciera, 1998).

Muitas macromoléculas depositam-se nos capilares glomerulares, onde a pressão sangüínea é aproximadamente quatro vezes maior que aquela dos demais capilares (Roitt *et al.*, 1997).

Ultraestruturalmente, os complexos imunes, tanto na membrana basal glomerular como em localização subepitelial, aparecem como corpúsculos densos. Os complexos que são pouco solúveis, grandes e de alta avidéz, ao invés de se localizarem nos capilares, freqüentemente penetram no mesângio, onde podem ser fagocitados por macrófagos e detectados como depósitos granulares densos. Outras

alterações ultraestruturais comumente vistas são fusões de podócitos e infiltrado de neutrófilos e monócitos (Confer e Panciera, 1998; Olson, 1998).

O diagnóstico de glomerulonefrite pode ser realizado pela demonstração de imunoglobulinas, antígeno e complemento nos tufo glomerulares, através das técnicas de imunofluorescência e imunoistoquímica. Em alguns casos de glomerulonefrite por complexos imunes, no entanto, o agente causal específico escapa à determinação. As lesões macroscópicas das glomerulonefrites agudas por complexos imunes são geralmente sutis. Os rins estão freqüentemente tumefeitos, apresentam a superfície capsular lisa, têm coloração normal ou pálida e glomérulos visíveis como pequenos pontos vermelhos, na superfície de corte do córtex. Se as lesões se resolvem, mas tornam-se subagudas ou crônicas, o córtex renal torna-se algo atrófico, com granularidade generalizada na superfície capsular. Na superfície de corte, o córtex pode estar adelgado e os glomérulos podem aparecer como pontos cinzentos. Com o tempo, a cicatrização pode desenvolver-se em todo o córtex.

Microscopicamente, as glomerulonefrites por complexos imunes apresentam uma dentre várias formas anatômicas. Embora existam várias classificações de glomerulonefrites, a classificação que se segue foi descrita por Confer e Panciera (1998):

- **Proliferativa:** quando há um aumento da celularidade do tufo glomerular, devido à proliferação das células glomerulares e influxo de leucócitos, envolvendo tanto as alças capilares como o mesângio.
- **Membranosa:** quando a alteração predominante é o espessamento difuso da membrana basal dos capilares.
- **Membranoproliferativa (mesangiocapilar/mesangioproliferativa):** quando estão presentes tanto a hiper celularidade quanto o espessamento da membrana basal.

Várias outras alterações acompanham as descritas acima, incluindo aderência entre o tufo glomerular e a cápsula de Bowman, hipertrofia e hiperplasia do epitélio parietal, trombos fibrinosos em capilares glomerulares e dilatação tubular com líquido proteináceo homogêneo. Um aumento da matriz mesangial freqüentemente acompanha estas alterações. Se o dano é discreto e a causa é

removida, os glomérulos podem cicatrizar sem lesões óbvias ou com lesões residuais mínimas. No entanto, se a lesão é prolongada, uma glomerulonefrite subaguda ou crônica se desenvolve. A cápsula de Bowman pode tornar-se espessada e hialinizada.

A proliferação do epitélio parietal, um influxo de monócitos e a deposição de fibrina pode resultar na formação de uma lesão intraglomerular hiper celular e semicircular conhecida como crescente glomerular. Pode ocorrer fibrose na crescente glomerular e, quando a cápsula de Bowman se rompe, a fibrose glomerular pode se tornar contínua com a fibrose intersticial. Fibrose periglomerular e intersticial e focos inflamatórios intersticiais de linfócitos e plasmócitos acompanham a glomerulonefrite crônica. Finalmente, os glomérulos se atrofiam e, com o aumento do tecido fibroso, da matriz mesangial e obliteração dos capilares glomerulares, tornam-se hialinizados. Esses glomérulos são hipocelulares e essencialmente não-funcionais, conduzindo a glomerulosclerose, que não é apenas o estágio final da glomerulonefrite, mas pode resultar em qualquer dano crônico que promove a perda da função do glomérulo ou do néfron (Confer e Panciera, 1998; Cattell e Jennette, 1998).

2.4. Glomerulopatias parasitárias mediadas por complexos imunes

Costa *et al.* (1991) induziram experimentalmente em camundongos, glomerulonefrite na doença de Chagas. O antígeno de *Trypanosoma cruzi* se depositou no glomérulo, junto com IgG, IgM e C3, na região mesangial, durante a fase crônica da doença.

Na dirofilariose crônica canina evidenciou-se glomerulonefrite mesangial proliferativa e membranoproliferativa, com depósitos de IgG no padrão contínuo na membrana basal, causados pela formação *in situ* de complexos imunes (Aikawa *et al.*, 1981). Nakagaki *et al.* (1993) demonstraram depósitos antigênicos de *Dirofilaria immitis*, IgG e C3 em cães com glomerulonefrite.

A glomerulonefrite imunomediada foi demonstrada na hidatidose ovina por Edelweiss e Lizardo-Daudt (1991). Proliferação celular glomerular foi evidente em 95 % das ovelhas e glomerulonefrite membranoproliferativa foi detectada em 80 % dos animais.

Gould e McInnes (1999) diagnosticaram em cães infectados por *Angiostrongylus vasorum* glomerulonefrite membranoproliferativa, sugestiva de lesão renal mediada por este parasito.

A glomerulonefrite, na esquistossomose, foi demonstrada por lesões glomerulares de padrão mesangioproliferativo e membranoproliferativo, e presença de depósitos granulares de imunoglobulinas, C3 e antígenos, envolvendo principalmente o mesângio, em ratos e camundongos, infectados experimentalmente (Natali e Cioli, 1976; Houba, 1979; Robinson *et al.*, 1982). Sobh *et al.* (1993) demonstraram glomerulonefrite em hamsters infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni*, concluindo que, a exposição ao antígeno por curto período, pode ser suficiente para estimular a cascata do complemento e tornar o dano glomerular permanente.

Glomerulonefrite membranoproliferativa e mesangioproliferativa, depósito de antígenos, presença de imunoglobulinas e componentes do complemento também ficaram evidentes na malária por *Plasmodium berghei* (Ehrich *et al.*, 1981; Sterzel *et al.*, 1982; Haines e Farmer, 1991; Sinniah *et al.*, 1999).

O envolvimento glomerular, evidenciado na leishmaníase, caracterizado por proliferação celular mesangial e espessamento da membrana, deposição de complexos imunes, representados pelo antígeno e pela presença de imunoglobulinas e componentes do sistema complemento foram demonstrados por Brito *et al.* (1975), Keenan *et al.* (1984), Oliveira *et al.*(1985), Sartori *et al.*(1987), Tafuri *et al.*(1989), Mancianti *et al.*(1989), Marcussen *et al.* (1989), Poli *et al.* (1991), Nieto *et al.* (1992), Sartori *et al.*(1992), Costa *et al.* (2000), Tafuri *et al.* (2001) e Mathias *et al.* (2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de Execução

Os rins bovinos e bubalinos foram obtidos no Frigorífico Líder S/A, em Viamão, RS.

Os fragmentos renais foram preparados no Laboratório do Setor de Helminthoses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, mesmo local da manutenção dos coelhos.

A confecção e a leitura das lâminas coradas por HE, PAS, TV, IFD, IFI e IHQ foram desenvolvidas no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SP-HCPA).

A fase de documentação fotográfica das lâminas foi desenvolvida no Laboratório Fotográfico do Setor de Histologia do Centro de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2. Material

3.2.1. Animais

Foram obtidas amostras de tecido renal de 51 bovinos (*Bos taurus*) e de 20 búfalos (*Bubalus bubalis*). Dos 71 animais, 27 bovinos e 11 búfalos apresentaram a *Fasciola hepatica* no fígado. Os 24 bovinos e os 9 búfalos utilizados como controle

negativo foram considerados aptos pelo Serviço de Inspeção para o consumo humano.

Três coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia, procedentes da mesma ninhada, foram mantidos em gaiolas individuais por 7 semanas para a obtenção de soro anti-*Fasciola hepatica*.

As fascíolas foram obtidas por dissecação dos fígados na mesa de inspeção de vísceras no frigorífico.

3.2.2. Reagentes e Soluções

3.2.2.1. Formalina a 10%

Formol comercial 40%	10,0 ml
Água destilada	90,0 ml

3.2.2.2. Solução de Duboscq-Brasil

Álcool etílico 80%	150,0 ml
Formalina a 10%	60,0 ml
Ácido acético glacial	15,0 ml
Ácido Pícrico	1,0 g

Dissolver o ácido pícrico em álcool e depois juntar a formalina. Antes de usar, adicionar o ácido acético glacial.

3.2.2.3. Hematoxilina de "Harris"

Hematoxilina	0,50 g
Álcool etílico 85%	5,0 ml
Alúmen de potássio	10,0 g
Óxido vermelho de mercúrio	0,15 g
Água destilada	100,0 ml

Dissolver a Hematoxilina no álcool e o alúmen a quente na água. Misturar as soluções. Levar a mistura à ebulição, remover do fogo e juntar o óxido de mercúrio. Aquecer novamente a solução até ficar vermelha escura, durante um minuto; em seguida, remover do fogo o recipiente e deixá-lo esfriar rapidamente. A solução, depois de resfriada, está pronta para o uso.

3.2.2.4. Eosina

Eosina Y	0,5 g
Água destilada	10,0 ml
Álcool etílico 95%	90,0 ml

Dissolver a eosina em água destilada e depois juntar o álcool.

3.2.2.5. Hematoxilina de Weigert

Solução A

Hematoxilina	1,0 g
Álcool etílico 95%	100,0 ml

Solução B

Cloreto férrico 30%	4,0 ml
Ácido clorídrico	1,0 ml
Água destilada	95,0 ml

Solução para uso

Misturar a solução A e B e usar imediatamente.

3.2.2.6. Ponceau xilidine com fucsina ácida

Ponceau xilidine

Ponceau xilidine	1,0 g
Ácido acético glacial	1,0 ml
Água destilada	99,0 ml

Fucsina ácida

Fucsina ácida	1,0 g
Ácido acético glacial	1,0 ml
Água destilada	99,0 ml

Solução para uso

Ponceau xilidine	1,0 ml
Fucsina ácida	2,0 ml
Ponceau xilidine	1,0 g
Ácido acético glacial	1,0 ml
Água destilada	99,0 ml

Fucsina ácida

Fucsina ácida	1,0 g
Ácido acético glacial	1,0 ml
Água destilada	99,0 ml

Solução para uso

Ponceau xilidine	1,0 ml
Fucsina ácida	2,0 ml

3.2.2.7. "Light Green"

Solução estoque

"Light green"	2,0 g
Ácido acético glacial	1,0 ml
Água destilada	99,0 ml

Solução para uso

"Light green" -solução estoque	20,0 ml
Água destilada	100,0 ml

3.2.2.8. Reagente de Schiff

Fucsina diamante	16,0 g
Metabissulfito de sódio	30,4 g
Ácido hidrocloreídrico 1 N	240,0 ml

Água destilada	1360,0 ml
----------------	-----------

Ferver a água. Retirar do fogo e colocar a fucsina.

Esfriar até 50 graus centígrados e filtrar. Juntar o ácido hidroclorídrico, esfriar mais um pouco e adicionar o meta-bissulfito de sódio. Deixar em repouso até esfriar totalmente. Acrescentar 32 gramas de carvão vegetal e agitar várias vezes. Filtrar em papel filtro extra-fino.

Conservar à temperatura de 4 graus centígrados até o momento do uso.

3.2.2.9. Álcool ácido 1%

Ácido clorídrico	1,0 ml
------------------	--------

Álcool absoluto	100,0 ml
-----------------	----------

Diluir o ácido no álcool.

3.2.2.10. Cloreto férrico 30%

Cloreto férrico	30,0 g
-----------------	--------

Água destilada	100,0 ml
----------------	----------

3.2.2.11. Ácido acético 1%

Ácido acético	10,0 ml
---------------	---------

Água destilada	1000,0 ml
----------------	-----------

3.2.2.12. Ácido periódico 0,5%

Ácido periódico	0,5 g
-----------------	-------

Água destilada	100,0 ml
----------------	----------

3.2.2.13. Ácido fosfomolibdico 1%

Ácido fosfomolibdico	1,0 g
----------------------	-------

Água destilada	100,0 ml
----------------	----------

3.2.2.14. Diafanizador

Xilol

3.2.2.15. Meio de inclusão

Parafina	1000,0 g
Cêra de abelha	3,0 g

3.2.2.16. Meio de montagem

Entellan

3.2.2.17. Tampão fosfato (PBS - Phosphate buffer solution) em pó

3.2.2.18. Gelatina

Solução A

gelatina pura	5,0 g
água destilada	25,0 ml

Solução B

água destilada	40,0 ml
glicerol	45,0 ml

Colocar as duas soluções à 50° C e misturar. Adicionar 2 gotas de solução antisséptica (Merceptil). Guardar em geladeira e aquecer em estufa, para amolecer, no momento do uso.

3.2.2.19. Anti-IgG bovina conjugada à fluoresceína (Produto n. F7887 – SIGMA)

3.2.2.20. Anti-IgG humana conjugada à fluoresceína (F0202-Dako, CA,USA)

3.2.2.21. Kit para imunistoquímica - DAKO LSAB + Peroxidase Universal, n. K0690.

3.2.2.22. Gel para congelamento "Tissue-Tek"

3.2.2.23. Adjuvante Completo de Freund

3.2.2.24. EDTA, leupeptina e pepstatina A

3.2.2.25. Protein Assay Kit (n. 23225, Pierce, USA)

3.3.2.26. Soro Molico para Imunoistoquímica

leite molico desnatado	15,0 g
tampão PBS	300,0 ml

3.3. Métodos

3.3.1. Seleção dos Animais

O exame pós-mortem do fígado, pelo Serviço de Inspeção Federal, consta de 5 procedimentos:

- a) exame visual das faces da peça;
- b) palpação
- c) cortar transversalmente e comprimir os ductos biliares da víscera;
- d) cortar em lâminas longitudinais os linfonodos;
- e) condenar, total ou parcialmente, quando existirem formas difusas ou circunscritas das afecções que tem implicação com a carcaça e demais órgãos, tais

como tuberculose, neoplasias, teleangectasias, cirrose, congestão, hidatidose, fasciolose, esteatose, cisticercose e perihepatite.

Os animais negativos para a *Fasciola hepatica* que fizeram parte do experimento foram obtidos aleatoriamente dentre os que estavam excluídos de qualquer patologia que os qualificassem como impróprios para o consumo humano. Seus fígados e rins, após exame macroscópico, foram selecionados.

Os animais positivos para *Fasciola hepática* na inspeção pós-abate, e escolhidos aleatoriamente, tiveram a comprovação do parasito nos canais biliares.

3.3.2. Coleta dos parasitos do fígado e biópsia renal

As fascíolas foram retiradas do fígado com pinça e colocadas imediatamente em frasco contendo solução salina estéril.

De cada animal foram retiradas amostras dos dois rins medindo aproximadamente 4 cm. Foram colocadas em frascos numerados contendo a solução de Duboscq-Brasil. Também foram coletados fragmentos dos rins que foram incluídos em meio de embebição ("Tissue-tek"), envoltos em papel alumínio e imediatamente congelados em recipiente contendo gelo seco.

3.3.3. Preparação das amostras para a produção dos antígenos.

Os parasitos foram retirados da solução salina e lavados várias vezes com o mesmo tipo de solução. Para a obtenção do antígeno somático, frascos com solução salina estéril receberam, cada um, 20 fascíolas. Para a obtenção do antígeno secretório-excretório, as fascíolas foram mantidas por 24 horas em solução salina estéril acrescida de EDTA (5 µg/ml), pepstatina A (2 µg/ml) e leupeptina (2µg/ml).

3.3.3.1 Produção do antígeno somático

Lotes de vinte fascíolas foram macerados com pistilo de vidro em cadinho com a adição de 20 ml de solução salina estéril. As amostras foram centrifugadas a

8000 x g por 30 minutos à 4° C. O sobrenadante foi retirado e dializado contra água destilada, “overnight” em geladeira, com a troca da água destilada aproximadamente de 2 em 2 horas. A solução obtida foi fracionada, colocada em frascos com capacidade para 50 ml. A dosagem da proteína foi avaliada pela técnica de Bradford (1976). As amostras foram então liofilizadas e armazenadas em congelador até o momento da inoculação. Os antígenos de *Fasciola hepatica* foram visualizados por imunistoquímica (Figura 13).

3.3.3.2. Produção do antígeno secretório-excretório

Cem parasitos foram lavados várias vezes com solução salina estéril. Foram colocados em frasco de vidro esterilizado contendo 400 ml de solução salina estéril acrescida de 2 mg de EDTA, pepstatina A e leupeptina, mantidos por 24 horas em geladeira. A solução foi colocada em tubos e centrifugada a 8000 x g por 30 minutos à 4° C. A amostra foi colocada em sacos de diálise e dializada contra água destilada, “overnight”, em geladeira, com troca da água destilada aproximadamente de 2 em 2 horas. Foram, então, colocadas em frascos com capacidade de 50 ml e submetidas a dosagem de proteínas pela técnica de Bradford (1976). As amostras foram liofilizadas e armazenadas em congelador até o momento da inoculação.

3.3.4. Inoculação dos coelhos

Os três coelhos foram colocados em gaiolas individuais. Na semana 1 foi feito o exame clínico e parasitológico dos animais. O coelho um foi inoculado com 0,5 ml de antígeno E/S acrescido de 0,5 ml de Adjuvante Completo de Freund. Foram inoculados 0,25 ml, via subcutânea, nas regiões axilar e inguinal. Foram feitas 5 inoculações, com intervalos semanais. Na quinta inoculação foi feita uma sangria de prova e na sexta semana foi executada a sangria total.

O coelho dois foi inoculado com o antígeno somático usando a mesma metodologia. O coelho três foi o controle. Após a sangria total, o sangue foi centrifugado, o soro separado, fracionado em porções de 1ml e mantido em congelador.

3.3.5 Fixação dos cortes renais

Os fragmentos renais foram fixados primeiro em solução de Duboscq-Brasil por 2-3 horas, em geladeira à temperatura de 4° C. Em seguida, foram passados em várias mudanças de álcool a 50 °GL para eliminar o ácido pícrico e então, colocados em formalina a 10%, durante 48 horas.

Os fragmentos renais embebidos em "Tissue-tek" foram mantidos em congelador a -70 °C até a execução das técnicas de Imunofluorescência.

3.3.6. Processamento

O material foi processado em aparelho histotécnico Ancap sob a técnica empregada no laboratório do SP-HCPA.

3.3.6.1. Desidratação

Conforme a técnica empregada no laboratório do SP-HCPA.

- a. álcool 100% - 60 min.
- b. álcool 100% - 60 min.
- c. álcool 100% - 60 min.
- d. álcool 100% - 60 min.
- e. álcool 100% - 60 min.
- f. álcool 100% - 60 min.

3.3.6.2. Diafanização

- a. xilol - 30 min.
- b. xilol - 60 min.

3.3.6.3. Impregnação em parafina

Conforme a técnica empregada no laboratório do SP-HCPA, feita em aparelho autoinclusor modelo OMA TR 86, ANCAP.

- a. Parafina - 30 min. a 63 °C
- b. Parafina - 30 min a 63 °C

3.3.6.4. Corte e preparo das lâminas

Os cortes para microscopia óptica foram feitos em micrótomo rotativo (modelo Spencer 820- Robert Schaw) na espessura de 4 micrômetros.

As lâminas foram desparafinadas em estufa (Soc. Fabbo Ltda) a 80 °C por 15 minutos.

3.3.7. Colorações

De cada amostra de tecido renal foram obtidos 3 cortes histológicos que receberam as colorações utilizadas neste experimento.

3.3.7.1. Hematoxilina-Eosina (H & E)

Conforme a técnica empregada no laboratório do SP-HCPA:

- a. Desparafinação e alcoolização em banhos de imersão;
 1. xilol aquecido por 5 min.;
 2. xilol por 5 min.;
 3. álcool absoluto por 2 min.;
 4. álcool absoluto por 5 min.;
- b. eosina por 1 min.;
- c. hematoxilina de Mayer por 7 min.;
- d. lavar em água corrente;
- e. passar rapidamente no álcool ácido;
- f. lavar em água corrente;

- g. passar rapidamente no carbonato de lítio para azular;
- h. lavar em água corrente;
- i. lavar em álcool;
- j. lavar em álcool;
- l. álcool por 2 min.;
- m. álcool por 2 min.;
- n. álcool por 2 min.;
- o. xilol por 2 min.;
- p. xilol por 2 min.;
- q. xilol por 2 min.;
- r. montar as lâminas.

3.3.7.2. Ácido Periódico de Schiff (PAS)

- a. desparafinização, alcoolização e hidratação;
- b. ácido periódico por 15 min.;
- c. lavagem em água destilada;
- d. reativo de Schiff por 15 min.;
- e. água sulfurosa por 15 min.;
- f. lavagem em água destilada;
- g. hematoxilina por 2 min.;
- h. lavagem em água corrente;
- i. desidratação, diafanização e montagem.

3.3.7.3. Tricrômico Verde (Tricrômico de Masson modificado) - (TV)

- a. desparafinização, alcoolização e hidratação;
- b. hematoxilina de Weigert por 5 min.;
- c. lavagem em água corrente por 5 min.;
- d. Ponceau xilidine com fucsina ácida por 5 min.;
- e. lavagem rápida em água destilada;
- f. ácido fosfomolibdico por 5 min.;

- g. lavagem rápida em água destilada;
- h. Light green por 1 hora;
- i. lavagem rápida em água destilada;
- j. ácido acético por 1 min.;
- l. desidratação, diafanização e montagem.

3.3.8. Imunofluorescência

3.3.8.1. Imunofluorescência Direta

- a. cortar o tecido congelado em criostato (modelo Kmostat 1720 - Digital Leitz) na espessura de 4 μ m e colocá-lo em lâmina de vidro;
- b. manter os cortes em cesta porta-lâminas, envoltos em papel alumínio, por 24 horas em congelador;
- c. colocar em banho de PBS por 5 min.;
- d. remover cuidadosamente do banho, secando ao redor da lâmina;
- e. aplicar uma gota de soro anti-IgG bovino (diluição 1:300) e manter por 30 min., em câmara úmida, no escuro e a temperatura ambiente;
- f. lavar os cortes por 5 min.em 3 banhos de PBS;
- g. montar com gelatina, colocando uma lamínula sobre o corte.

3.3.8.2. Imunofluorescência Indireta

- a. cortar o tecido congelado em criostato na espessura de 4 μ m e colocá-lo em lâmina de vidro;
- b. manter os cortes em cesta porta-lâminas, envoltos em papel alumínio, por 24 horas no congelador;
- c. colocar em banho de PBS por 5 min.;
- d. remover cuidadosamente do banho, secando ao redor da lâmina;
- e. aplicar uma gota do soro IgG bovino por 30 minutos em câmara úmida, no escuro, a temperatura ambiente;
- f. colocar em banho com PBS, por 5 minutos, por 3 vezes;

- g. remover do banho e secar cuidadosamente ao redor do corte;
- h. aplicar uma gota de soro humano anti-IgG (diluição 1:20) sobre o corte, manter por 20 minutos em câmara úmida, no escuro, a temperatura ambiente;
- i. lavar com PBS por 5 minutos, 3 vezes;
- j. remover do banho e secar cuidadosamente ao redor do corte;
- l. montar com gelatina, colocando uma lamínula sobre o corte.

3.3.9. Imunoistoquímica (IHQ)

Conforme a técnica empregada no laboratório do SP-HCPA.

- a. os fragmentos renais emblocados em parafina e cortados com 4µm de espessura foram fixados em lâmina contendo cola (Silano);
- b. colocar as lâminas em estufa a 36 °C por 24 horas e por 2-12 horas a 56 °C;
- c. xilol por 10 min.;
- d. xilol por 5 min.;
- e. xilol por 5 min.;
- f. álcool - só banho;
- g. álcool por 5 min.;
- h. álcool - só banho;
- i. álcool por 5 min.;
- j. lavar em água destilada;
- l. por as lâminas em PBS por 5 min.;
- m. colocar em microondas com tampão citrato, pH 6,0, com os seguintes tempos: 5 minutos em potência alta, 2 minutos em descanso, 5 minutos em potência alta, 2 minutos em descanso, 8 minutos em potência alta, 20 minutos no microondas desligado, 15 minutos fora do microondas;
- n. escorrer o tampão, acrescentar o PBS e deixar por 5 minutos, escorrer;
- o. colocar peróxido de hidrogênio à 5% diluído em água destilada e deixar por 20 minutos. Repetir esta etapa mais uma vez;
- p. escorrer e lavar com PBS;
- q. incubar com soro molico por 30 minutos até uma hora;

- r. lavar em água corrente;
- s. lavar em água destilada;
- t. escorrer e circular o corte com caneta Dakopen, retirando o excesso de líquido da lâmina;
- u. pingar o soro de coelho anti-*Fasciola hepatica* (pool), na diluição 1:300;
- v. colocar em câmara úmida por 1 hora;
- x. lavar lâmina por lâmina com PBS;
- z. colocar as lâminas em cuba com PBS por 10 minutos, trocando 3 vezes o PBS, neste intervalo;
- aa. preparar a solução 1 do Kit para IHQ;
- ab. pingar a solução 1 e incubar por 30 minutos;
- ac. lavar 3 vezes com PBS;
- ad. preparar a solução 2 do Kit para IHQ, 30 minutos antes de utilizar;
- ae. pingar a solução 2 e incubar por 30 minutos;
- af. lavar 3 vezes com PBS;
- ag. preparar o DAB do Kit para IHQ, 10 minutos antes de aplicar;
- ah. pingar o DAB lâmina por lâmina;
- ai. colocar em cuba com água destilada;
- aj. contracoloração com Hematoxilina de Meyer em câmara escura por 15 a 30 min.;
- al. lavar em água corrente;
- am. lavar em água destilada;
- an. desidratar com álcool absoluto por 3 vezes;
- ao. colocar no xilol 3 vezes;
- ap. montar com bálsamo do Canadá;
- aq. etiquetar.

3.3.10. Leitura das lâminas

Todas as lâminas coradas para histologia em HE, PAS, TV e IHQ foram lidas em microscópio óptico de observação dupla modelo Standard 20 (Zeiss KF).

Todas as lâminas de imunofluorescência foram observadas em microscópio marca Olympus CBA-K, equipado com dispositivo para imunofluorescência.

3.3.11. Documentação das imagens

As microfotografias dos cortes corados em HE, PAS, TV e para IHQ, previamente selecionadas, foram obtidas em máquina fotográfica modelo M35FA (Nikon), acoplada a microscópio óptico modelo SMZ-10, utilizando filme fotográfico Plus Kodak com ASA 100.

As microfotografias dos cortes de imunofluorescência direta e indireta foram feitas em equipamento Nikon modelo UFX-DX, utilizando filme Plus Kodak, com Asa 400 e Kodak TX 400.

4. ARTIGO 1

No Artigo 1 relata-se a prevalência de fasciolose bovina no estado do Rio Grande do Sul. A prevalência foi de 10,34 % (19 animais). Os bovinos foram abatidos sob Inspeção Estadual, no Frigorífico Líder, em Viamão, RS. O frigorífico recebe animais procedentes de todo o estado. A coleta de material ocorreu de abril a dezembro de 1999. Os trematódeos, fígados e rins dos animais positivos e os fígados e rins dos animais controle foram procedentes dos municípios de Cachoeirinha, Cachoeira do Sul, Charqueadas, Capivari do Sul, Charqueadas, Encruzilhada do Sul, Ibiraiaras, Palmares do Sul, Pantano Grande, Rio Pardo, Tupanciretã e Viamão. Os animais procedentes dos municípios de Cachoeira do Sul, Capivari do Sul, Ibiraiaras e Tupanciretã não estavam infectados por *Fasciola hepatica*.

A seleção das amostras de fígados para a obtenção do parasito foi necessária para a produção dos antígenos somáticos e secretórios-excretórios. Entretanto, dados de prevalência da fasciolose em bovinos criados em propriedades gaúchas, não são rotineiramente divulgados. Muller *et al.* (1997) realizaram estudo retrospectivo da fasciolose pelo exame de fígados de animais abatidos em frigorífico, nos anos de 1993 a 1997. Santos et al (1999) determinaram prevalência de fasciolose em bovinos de 18 municípios gaúchos, através do diagnóstico parasitológico. Desta data em diante, existe uma lacuna a cerca da distribuição do parasito e de sua prevalência, o que objetivou este artigo, avaliar a ocorrência nos animais procedentes de diversas regiões e avaliar a alteração na taxa de infecção, importantes na dinâmica do parasito, seu hospedeiro intermediário e novas áreas onde o parasito pode ser encontrado.

Fasciola hepatica*: Prevalence of bovine fascioliasis in the State of Rio*Grande do Sul, Brazil**

Running title: Bovine fascioliasis in southern Brazil

Sandra Márcia Tietz Marques¹; Maria Lúcia Scroferneker²

Corresponding author:

Dr. Maria Lúcia Scroferneker

Rua Vasco da Gama, 176/60

CEP 90040-111 Porto Alegre / RS-Brazil

Tel.: +5551 3311 0685

Fax: +5551 3316 3155

e-mail: scrofern@vortex.ufrgs.br and santietz@zipmail.com.br

Abstract

¹ Veterinarian doctor and graduate student, Escola Agrotécnica Federal de Concórdia, EAFC, Km 108, Concórdia, Santa Catarina, Brasil, CEP: 89700-000. Te!. + 55 49 4449090.

² Professor, Department of Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Vasco da Gama 176/604, Porto Alegre, Brasil, CEP 90040-111. Tel.: +55 51 3311 0685.

We examined 377 livers from cattle slaughtered at a meat packing plant, between April 1999 and December 1999, in Viamão, a town in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The caule slaughtered at the meat packing plant belonged to other eleven towns: Cachoeira do Sul, Cachoeirinha, Capivari do Sul, Charqueadas, Encruzilhada do Sul, Ibiraiaras, Palmares do Sul, Pantano Grande, Rio Pardo, Tupanciretã and Viamão. The prevalence rate of *Fasciola hepatica* was 10.34% (39 animais) in seven of the eleven towns included in the study (63.6%). The livestock from Cachoeira do Sul, Capivari do Sul, Ibiraiaras and Tupanciretã were not infected with fascioliasis.

Keywords: trematode; *Fasciola hepatica*; bile duct; cattle

Introduction

Bovine fascioliasis caused by the trematode *Fasciola hepatica* is a worldwide

parasitic disease common in ruminants, especially cattle, buffaloes, sheep goats, and swine. It may, however, affect humans (Ramos et al 1993; Acosta 1994; Claxton et al. 1997; Wacker 1999; Ortiz et al. 2000). Once ingested, parasites migrate through the liver parenchyma to reach the bile ducts. In cattle, the liver is damaged and condemned, and the subclinical and chronic disease usually results in decreased production of meat, milk and wool, secondary bacterial infections, fertility problems, and great expenses with anthelmintics (Olaechea et al. 1989; Eddi 1990; Dalton 1999).

Chronic fascioliasis-confirmed by the inspection of rural properties and meat packing plants, and coprological examination of fecal material-was detected in the States of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro and Minas Gerais; however, data on the geographic distribution and on the prevalence of fascioliasis in the livers of animais are normally found to a moderate extent in the literature (Serra-Freire 1995b; Serra-Freire et al. 1995). The present study aimed at assessing the prevalence rates for bovine fascioliasis in different towns of the State of Rio Grande do Sul.

Materials and methods

Our study was carried out at Líder meat packing plant, between April 1999 and December 1999, in Viamão, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The slaughtered animals belonged to the following towns: Cachoeira do Sul, Cachoeirinha, Capivari do Sul, Charqueadas, Encruzilhada do Sul, Ibiraiaras, Palmares do Sul, Pantano Grande, Rio Pardo, Tupanciretã and Viamão. To determine the presence of *Fasciola hepatica*, the bile ducts of 377 animals were dissected longitudinally.

Results

Of the 377 livers examined, 39 were infected with *Fasciola hepatica*, producing a positivity rate of 10.34%. Out of the eleven towns included in our study, seven (63.6%) presented bovine fascioliasis. The livers belonging to animais from Cachoeira do Sul, Capivari do Sul, Ibiraiaras, and Tupanciretã, corresponding to 36.3%, were not infected. Figure 1 shows the location of the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, where *Fasciola hepatica* was detected.

Table I. Positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of liver specimens collected at a meat packing plant in Viamão, State of Rio Grande do Sul, Brazil, between April 1999 and December 1999.

	Infected	Uninfected	Total
PPV	39	0	39
NPV	0	338	338
Total	39	338	377

Figure 1 .Location of the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, where *Fasciola hepatica* was detected.



Discussion

Bovine fascioliasis was identified in Brazil in 1921(Lutz 1921). Although official data on this parasite infection are rarely found, the losses are believed to be extremely high, contributing towards the poor exploration of cattle raising in our country (Beck 1985). Fascioliasis is usually observed in the southern and southeastern regions of Brazil, where it has an endemic nature. In these regions, the infection rate of dairy cattle ranges between 10 and 100% (Serra-Freire 1995a). Silva et al. (1989) found a fascioliasis prevalence rate of 7.2% in the livers of animais slaughtered in 1978 in the state of Rio Grande do Sul, from a total of 46,002 animais. Ueno et al. (1982) observed a prevalence rate higher than 90% of *Fasciola hepatica* eggs among sheep and cattle in the state of Rio Grande do Sul, in addition to losses of 12-13% due to noncompliance with the liver quality standards established by governmental authorities. Beck (1985) analyzed the prevalence rate of fascioliasis among 770 dairy cattle in the valley of Itajaí and in the coastal region of the state of Santa Catarina (including 19 municipalities), between September 1980 and September 1981. The prevalence rate was 100% in the analyzed municipalities, reaching 91.5% of 82 rural properties and 46% of the animais.

The actions taken by the State Program for the Control of Bovine Fascioliasis were based upon the information provided by the Brazilian Meat Inspection System, whose headquarters are located in the grasslands of Rio Grande do Sul. In Rio Grande do Sul, the infection caused by *Fasciola hepatica* is endemic, with condemnation of 52.14% (between 1982 and 1988) and 27.4% (between 1989 and 1992) of the livers. The liver condemnation rate was never less than 30% in the last ten years. Echevarria (1985) reported that the condemnation rate in Brazilian

endemic regions has been rising. Between 1958 and 1963, the rates were 8%, rising to 11.5% between 1974 and 1999, and amounting to 14.7% in 1984, with the condemnation of 14,2980 infected livers. Although our study was conducted in a smaller meat packing plant where 377 were examined, the liver condemnation rate (10.34%) was similar to the prevalence rate reported by other authors in different regions of the country.

Serra-Freire and Nuernberg (1992) carried out a retrospective study (1977-1988) on *Fasciola hepatica* in cattle and buffaloes in 129 (64.8%) municipalities of the state of Santa Catarina. The presence of *Fasciola hepatica* eggs was confirmed in 88 (68.21%) municipalities, with a 27.86% prevalence rate for the cattle, and 24.72% for the buffaloes. The Federal Meat Inspection Service of the Ministry of Agriculture of Rio Grande do Sul registered a condemnation rate of 13.27% in 1992 due to *Fasciola hepatica* (SerraFreire 1995). The economic losses due to the condemnation of 250,000 fluke-infected livers cost U\$ 140,000,00, representing 15% of the livers inspected at official meat packing plants in the state of Rio Grande do Sul, and in infected properties approximately nine dollars are lost per animal due to reduced weaning weight at slaughter. Müller et al. (1997) retrospectively studied the condemnation of livers infected with fascioliasis, from May 1993 to May 1997, through the Federal Meat Inspection Service at meat packing plants in the southern region of Rio Grande do Sul, and observed a prevalence rate of 13.2% in animals from Santa Vitória do Palmar, Cristal, Camaquã, Herval, Bagé, Dom Pedrito, São Lourenço, Rio Grande, Tapes, Hulha Negra, Pinheiro Machado, Canguçu, Encruzilhada do Sul, Caçapava do Sul, Candiota, Lavras, Amaral Ferrador and Cruz Alta. The 10.34% prevalence rate for fascioliasis found in our study is similar to that

reported by other authors in different regions of the state. Santos et al. (1999) analyzed the stool of 1,235 calves from 18 towns in the state of Rio Grande do Sul. The prevalence of *Fasciola hepatica* eggs was 55.5% (685). Luz et al. (1999) investigated stool specimens of 29 bovines in Curitiba, state of Paraná, and observed a prevalence rate of 45% for fascioliasis. Epidemiological studies on fascioliasis are of paramount importance in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, so that zoonotic areas can be investigated. In addition, it is necessary to study the epidemiology of the parasite in different regions in order to achieve a cost-effective control and obtain further information about the host, the parasite, and its habitat.

References

Acosta D. 1994. Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en el Uruguay. p. 233-256. In: Nari A. e Fiel C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos -Bases para su prevención y control. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo.

Beck A. A. H. 1985. Fasciolose bovina. Boletim Técnico 33, Florianópolis, EMPASC, 18 p.

Claxton J. R., Zambrano H., Ortiz P., Amorós C., Delgado E., Ecurra E., Clarkson M.J. 1997. The Epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Paras. Intern.* 46 (4): 281-288.

Dalton J.P. 1999. Fasciolosis. 1. Ed, Cabi Publishing, University Press, Cambridge, p. 113-149.

Echevarria F. A. M. 1985. Fasciolose-Ocorrência, Diagnóstico e Controle. *Agroquímica Ciba-Geigy* 27:4-9.

Eddi C. 1990. Distomatosis: epidemiological and economic aspects of this zoonosis. Proceedings Symposium on the Epidemiology of Food-borne Parasitic Zoonoses. In: X Latin American Congress of Parasitology, I Uruguayan Congress of Parasitology Montevideo, p. 50-59.

Lutz, A. 1921. Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro.

Bol. Inst. Oswaldo Cruz, 1 (1): 9-13.

Luz J. E., Focaccia Siciliano R., de Oliveira A. G. & Pisani J. C. 1999. Human fascioliasis in the metropolitan area of Curitiba, Brazil. Evaluation of the foci of infection and report of nine cases treated with Triclabendazole. Braz. J. Infect. Dis. 3 (6): 220-225 (Resumo).

Müller G., Jesus L. P. de, Pausen R. M. M. & Souza C. A. 1997. Prevalência de fasciolose na região Sul do RS. Anais II Congr. Med. Vet., Gramado, p.186 (Resumo).

Olaechea F.V. 1989. *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum*. Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en la Argentina. Cap 10, p. 213-232. In: Nari A., Fiel C., Editorial Hemisferio Sur, Montevideo

Ortiz P. L., Claxton J. R., Clarkson M. J., McGarry J. Williams D. J. 2000. The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. Vet. Parasitol., 93 (2): 121-134.

Ramos A. M., Romero H. Q., Molina C. G. & Martínez M. H. 1993. Frecuencia de fascioliosis a través de cuatro técnicas de diagnóstico en toros sacrificados en la plaza México. Vet. Méx. 24 (3): 239-241.

Santos, A.R. dos, Gomes, M.J.T.M., Castro, E.S. de, Bastos, C.D. 1999. Ocorrência de

Fasciola hepatica em bovinos da Grande Porto Alegre, RS, Brasil. Rev. Bras. Med. Vet. 21(3):1 19-120.

Serra-Freire N.M. & Nuernberg S. 1992. Dispersão geopolítica da ocorrência de *Fasciola hepatica* no Estado de Santa Catarina, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87 (supl.I), p.263-269.

Serra-Freire N. M. da. 1995a. Se descuidar, a fascíola mata. A Granja 51(564):28-31.

Serra-Freire N. M. 1995b. Fasciolose hepática. A Hora Veterinária, ed extra 1:13-18.

Serra-Freire N. M. da, Bordin E. L., Lessa C. S. S., Scherer P.O., Farias M. T., Malacco M.A. Corrêa T. C. & Tschumi J. A. 1995. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. A Hora Veterinária, ed. extra 1: 19-21.

Silva I.C., Müller G., Mattos M. J. T. de, Castro A. L. D. de, Almeida J. E. M. de & Ueno H. 1989. Fasciolose. 1. Incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. Lavoura Arrozeira 33 (323): 34-42.

Ueno H., Gutierrez V. C., Mattos M. J. T. & Müller G. 1982. Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. Vet Parasit. 11(2-3): 185-191.

Wacker K., Roffeis M. & Conranths F. J. 1999. Cow-calf herds in East Germany: status quo of some parasite species and a comparison of chemoprophylaxis and

pasture management in the control of gastrointestinal nematodes. Zentralbl. Veterinarmed. 46 (7): 475-483.(Abstract).

5. ARTIGO 2

No Artigo dois relata-se a prevalência da fasciolose em búfalos abatidos sob Inspeção Estadual, no Frigorífico Líder S/A, em Viamão, Rio Grande do Sul. A prevalência foi de 20 % (21 animais). Por faixa etária, para os búfalos de até 2 anos de idade a prevalência foi de 81 % e de 19 % para os animais acima de 2 anos de idade. O estado do Rio Grande do Sul tem 600 propriedades com criação de búfalos. Dados da Associação Sulina de Criadores de Búfalos (Ascribu) relataram que a população bubalina é de 300000-400000 cabeças, com registro de crescimento anual de 15 %. O frigorífico recebe para abate animais procedentes de todo o Estado. A coleta de material ocorreu de abril a dezembro de 1999. Os trematódeos, fígados e rins dos búfalos positivos e os fígados e rins dos animais controle negativo foram procedentes dos municípios de Encruzilhada do Sul, Ibiraiaras, Parobé, Santo Antônio da Patrulha e Uruguaiana. Os animais de Uruguaiana foram negativos ao exame de coleta dos parasitos no fígado. Parobé foi o município com a mais alta taxa de prevalência, 44,5 % dos animais amostrados estavam parasitados, embora o tamanho da amostra tenha sido pequeno; Encruzilhada do Sul demonstrou menor prevalência de fasciolose (4,3 %).

A seleção das amostras de fígados para a obtenção das formas adultas de *Fasciola hepatica* foi necessária para a produção de antígeno somático e secretório-excretório. Entretanto, registros de prevalência da fasciolose em búfalos criados em propriedades gaúchas, são escassos. Estudos epidemiológicos em regiões endêmicas para a fasciolose, são importantes para mapear a distribuição e disseminação desta parasitose.

***Fasciola hepatica* infection in buffaloes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil**

Sandra Márcia Tietz Marques¹; Maria Lúcia Scroferneker²

Corresponding author:

Dr. Maria Lúcia Scroferneker

Rua Vasco da Gama, 176/604

CEP 90040-111

Porto Alegre / RS .Brazil

Tel.:+555133110685

Fax:+55 51 3316 3155

e-mail: scrofern@vortex.ufrgrs.br
santietz@zipmail.com.br

¹Veterinarian doctor and graduate student, Escola Agrotécnica Federal de Concórdia, EAFC, Km 108, Concórdia, Santa Catarina, Brasil, CEP: 89700-000. Tel. + 55 49 4449090.

² Professor, Department of Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Vasco da Gama 176/604, Porto Alegre, Brasil, CEP 90040-111. Tel.: +55 51 3311 0685.

Resumo

Foram examinados fígados de 105 búfalos abatidos em frigorífico, entre abril e novembro de 1999, em Viamão, RS, Brazil. Os animais eram procedentes dos municípios de Ibiraiaras, Parobé, Santo Antônio da Patrulha e Uruguaiana. A prevalência de *Fasciola hepatica* foi de 20% (21 animais) em 4 das 5 cidades incluídas no estudo. Por faixa etária, para os búfalos de até 2 anos de idade a prevalência foi de 81% e de 19% para os animais acima de 2 anos de idade.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: búfalos, *Fasciola hepatica*, prevalência

Abstract

One hundred five livers from buffaloes slaughtered at a meat packing plant were examined between April 1999 and November 1999, in Viamão, a town in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The buffaloes belonged to the following towns: Ibiraiaras, Parobé, Santo Antônio da Patrulha, and Uruguaiana. The prevalence rate of *Fasciola hepatica* was 20% (21 animals) in four of the five towns included in the study. In terms of age, the prevalence rate was 81% for buffaloes with up to two years of life and 19% for buffaloes older than two years.

INDEX TERMS: buffaloes, *Fasciola hepatica*, prevalence

Introduction

Fascioliasis caused by the trematode *Fasciola hepatica* is a common parasitic disease that affected ruminants, especially cattle, buffaloes, sheep, goats, and swine (Salcha 1991). The fluke life cycle requires an intermediate snail host to complete its transmission to a ruminant host (Briskey 2001). Humans can become infected by ingesting freshwater plants (especially watercress) that contain metacercariae. In animals, once ingested, parasites migrate through the liver parenchyma to reach the bile ducts. In ruminants, the liver is damaged and condemned, and the subclinical and chronic disease usually results in decreased production of meat, milk, and wool, secondary bacterial infections, fertility problems, and great expenses with anthelmintics (Dalton 1999). Fascioliasis was detected in the States of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, and Minas Gerais. In Brazil, data on the geographic distribution and on the prevalence of fascioliasis in buffaloes are normally found to a moderate extent in the literature. The present study aimed at assessing the prevalence rates for fascioliasis in buffaloes in different towns of the state of Rio Grande do Sul - regions that were not included in previous studies.

Material and Methods

This study was carried out at Líder meat packing plant, between April 1999 and November 1999 in Viamão, state of Rio Grande do Sul, Brazil. The slaughtered

animals belonged to the following towns: Encruzilhada do Sul, Ibiraiaras, Parobé, Santo Antônio da Patrulha, and Uruguaiiana. To determine the presence of *Fasciola hepatica*, the bile ducts of 105 animals were dissected longitudinally.

Results

Of the 105 livers examined, 21 were infected with *Fasciola hepatica*, producing a positivity rate of 20%. Out of the five towns included in study, four (80%) presented buffaloes infected by fascioliasis. The livers belonging to animais from Uruguaiiana, corresponding to 20%, were not infected. Flukes were found in 17 buffaloes (81%) aged two years or less, and in four animais (19%) older than two years.

Table 1 shows the prevalence of *Fasciola hepatica* in buffaloes in the five towns studied.

Town	Positive	Negative	Total
Encruzilhada do Sul	1 (4.3%)	22 (95.7%)	23 (100%)
Ibiraiaras	1(10%)	9 (90%)	10 (100%)
Parobé	4 (44.5%)	5 (55.5%)	9 (100%)
Santo Antônio da Patrulha	15 (36.6%)	26 (63.4%)	41(100%)
Uruguaiiana	-	22 (100%)	22 (100%)
Total	21(20%)	84 (80%)	105 (100%)

Figure 1 shows the location of the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, where *Fasciola hepatica* was detected.



Discussion

Fascioliasis was identified in cattle by Lutz in 1921. Fascioliasis is usually observed in the southern and southeastern regions of Brazil, where it has an endemic nature. The total amount of buffaloes is estimated at 3 million, with a 10% annual growth rate. Brazil's buffalo population is distributed as follows: 50% in the northern region, 14% in the northeast, 15% in the southeast, 12% in the Midwestern region, and 9% in the south. The state of Rio Grande do Sul contains 300-400 thousand heads and 600 buffalo keepers, which corresponds to 1.3% of the cattle herd in the state. In Brazil, meat production is a primary goal and, in this case, parasitic diseases are a limiting factor; in spite of this, the presence of *Fasciola hepatica* in buffaloes is not

frequently studied (Beck, 1985; SerraFreire, 1995). Ueno et al. (1982) observed a 12-13% prevalence rate for fascioliasis in cattle in farms of Rio Grande do Sul where two Lymnaeid snails, *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella*, are usually found, and serve as intermediate hosts of *Fasciola hepatica*. The analysis of random samples revealed an 81% prevalence rate for buffaloes aged less than two years, and 19% for those older than two years. Parobé was the town with the highest prevalence rate, that is, 44.5% of the animals studied were infected, although the sample size was small. In Santo Antônio da Patrulha, 36.6% of the animais presented fascioliasis. In Ibiraiaras and Encruzilhada do Sul, respectively 10% and 4.3% of the animals were infected. The buffaloes belonging to Uruguaiana were not infected by *Fasciola hepatica*. Müller et al. (1997) reported a 10-15% prevalence rate for fascioliasis in cattle in Encruzilhada do Sul, a town in the south of Rio Grande do Sul, indicating the extension of this parasitic infection (with lower rates) to buffaloes raised therein. This study showed a mean prevalence rate of 20%, which is in agreement with the data obtained by Serra-Freire and Nuernberg (1992), who found a 24.72% prevalence rate in the state of Santa Catarina. and concluded that the southern region of Brazil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná) is endemic to fascioliasis in ruminants. Epidemiological studies on fascioliasis are of paramount importance in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, so that zoonotic areas can be investigated. The studied areas may represent important endemic regions to fascioliasis in buffaloes.

Acknowledgements

We thank Líder meat packing plant, located in Viamão, state of Rio Grande do Sul, and Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) for granting us permission to use its Laboratory of Helminthology.

References

- Beck, A. A. H. (1985). Fasciolose bovina. Boletim técnico número 33. Empresa catarinense de pesquisa agropecuária S/A(EMPASC), Florianópolis, 18 p.
- Briskey, D. W. (2001). Diagnosis of liver fluke infection in cattle. A Diagnostic Rev. Meril Veterinary Bulletin. File: //D: \\Ivomec.Plus\98018.htm. 02/23/01. 4 p.
- Dalton, J.P. (1999). Epidemiology and control. In: Fasciolosis, Dalton J.P. (Ed.), CABI Publishing, University Press, Cambridge, UK, p 113-149.
- Lutz. A. (1921). Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. Bol. Inst. Oswaldo Cruz, 1(1), 9-13.
- Müller, G., Jesus, L.P. de, Paulsen, R.M.M., Souza, C.A (1997). Prevalência de fasciolose na região sul do RS. Anais: II Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Outubro, Gramado, SOVERGS, RS, p.1 86.

Saleha, A .A. (1991). Liver fluke disease (fascioliasis): epidemiology, Economic impact and public health significance. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 22 (suppl.), 36 1-364.

Serra- Freire, M.M. da, Nuernberg, S. (1992). Geopolitical distribution of the occurrence of *Fasciola hepatica* in Santa Catarina State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87 (suppl. 1), 263-269.

Serra- Freire, M.M. da. (1995). Fasciolose hepatica. A Hora Veterinária, ed. extra, 1, 13-18.

Ueno, H., Gutierrez, V.C., de Mattos, M.J. Müller, G. (1982). Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. Vet. Parasitol. 11(2-3), 185-191.

6. ARTIGO 3

O Artigo três, denominado “ Kidney pathology in cattle naturally infected by *Fasciola hepatica*” objetivou demonstrar, pela primeira vez, a ocorrência de glomerulonefrite mediada por complexos imunes decorrente da infecção por *Fasciola hepatica*. Rins de 51 bovinos, 27 com infecção natural por *Fasciola hepatica* e 24 bovinos controle, foram utilizados. As amostras eram procedentes do Frigorífico Líder, em Viamão, RS.

As biópsias renais foram processadas para microscopia óptica, microscopia de imunofluorescência e para imunoistoquímica. Para o diagnóstico histopatológico, a classificação do padrão de doença renal foi a descrita por Schwarts (1998) e Cotran et al. (1999), que avaliam glomérulo, túbulos renais e alterações intersticiais. As colorações de eleição foram Hematoxilina e Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Tricrômico de Masson (TV). Para a imunofluorescência direta foi utilizado o anti-IgG bovino anti-*Fasciola hepatica*. Para a imunofluorescência indireta, o anti-IgG bovino e o anti-IgG humano. Para a técnica de imunoistoquímica, foram produzidos soros de coelhos anti-*Fasciola hepatica*.

Dos 27 bovinos portadores de fasciolose, 21 (77,8%) apresentaram lesão renal; destes, 12 (44,5 %) diagnosticados com glomerulonefrite membranoproliferativa (Figuras 3, 4, 5, 6), 9 (33,3 %) diagnosticados com glomerulonefrite mesangioproliferativa (Figura 7) e 6 (22,2 %) não apresentaram alterações renais.

O diagnóstico por imunofluorescência direta revelou 100 % de positividade para todos os animais parasitados, com depósitos granular e pseudolinear de IgG nos glomérulos; na imunofluorescência indireta, 70,4 % das biópsias destes animais

mostraram depósitos granulares linear e pseudolinear de IgG (Figuras 8, 9, 10). Estes resultados também foram obtidos por outros autores com antígenos parasitários e pesquisa de IgG no glomérulo renal (Andres e Mc Clusky, 1975; Valli e Fusberg, 1979; Sartori et al.,1987; Grauer et al.,1987,1989; Edelweiss e Lizardo-Daudt, 1991; Goldstein, 1992; Casarosa et al.,1992). A análise imunoistoquímica das biópsias renais revelou a presença do antígeno de *Fasciola hepatica* (Figura 12). Estes resultados concordam com os achados por vários pesquisadores, quando demonstraram glomerulonefrite de padrão membranoproliferativo e mesangioproliferativo e a presença de anticorpo e do antígeno parasitário específico, relacionando o dano renal com a deposição de complexos imunes (Robinson et al.,1982; Mancianti et al.,1989; Poli et al., 1991; Nieto et al., 1992; Costa et al., 2000; Tafuri et al., 2001).

Biópsias renais de 6 bovinos (22,2 %) parasitados por *Fasciola hepatica*, não demonstraram glomerulonefrite, que poderia ser explicada ou pela pequena quantidade de fascíolas encontradas nestes fígados, ou pelo “status” nutricional e imunológico destes animais. Outra hipótese seria a lesão histopatológica não estar presente no corte padrão, escapou a detecção. A negatividade das glomerulonefrites concordaram com os achados pela imunofluorescência indireta que apresentou positividade de 70,4 %. Este percentual de positividade concorda com trabalhos de hipersensibilidade tipo III em outras patologias parasitárias (Keenan et al., 1984; Costa et al., 2000).

O diagnóstico histopatológico das biópsias renais dos animais controle revelou que 20 (83,34 %) não apresentaram doença renal. A biópsia renal de 1 animal (4,2 %) revelou glomerulonefrite mesangioproliferativa, e 3 biópsias (12,5 %) apresentaram outras alterações, compatíveis com nefrite intersticial aguda e infiltrado inflamatório focal (Figura 13).

As técnicas de imunofluorescência direta e indireta foram negativas na demonstração de IgG, bem como a presença de antígenos de *Fasciola hepática* (Figura 11).

As amostras renais de 4 bovinos do grupo controle apresentaram alteração histopatológica, sem o envolvimento imunológico renal correspondente, com a probabilidade de ocorrência de outra etiologia, que não foi o objetivo desta pesquisa.

Os resultados apresentados no Artigo três, demonstraram, pela primeira vez, que o dano renal representado pela glomerulonefrite em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*, resultou da deposição de complexos imunes circulantes no rim em resposta a presença do parasito.

Kidney pathology in cattle naturally infected by *Fasciola hepatica*

Sandra Márcia Tietz Marques¹; Maria Lúcia Scroferneker²; Maria Isabel Albano, Edelweiss³

Corresponding author:

Dr. Maria Lúcia Scroferneker

Rua Vasco da Gama, 176/604

CEP 90040-111

Porto Alegre / RS - Brazil

Tel.: +55 51 3311 0685

Fax: +55 51 3316 3155

e-mail: scrofern@vortex.ufrgs.br and santietz@zipmail.com.br

¹ Veterinarian doctor and graduate student, Escola Agrotécnica Federal de Concórdia, EAFC, Km 108, Concórdia, Santa Catarina, Brasil, CEP: 89700-000. Tel. + 55 49 4449090.

² Professor, Department of Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Vasco da Gama 176/604, Porto Alegre, Brasil, CEP 90040-111. Tel.: +55 51 3311 0685.

³ Professor, Department of Pathology, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 1954/ 702, Porto Alegre, RS. CEP: 90035-002 Tel-Fax: + 55 51 3330 7030.

Abstract

Kidney specimens of 51 animals, 27 with fascioliasis and 24 uninfected animals (controls), were examined by light microscopy, direct immunofluorescence (DIF), indirect immunofluorescence (IIF), and immunohistochemical analysis. The sections stained with hematoxylin and eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS) and trichrome (Masson & Trichrome) revealed mesangioproliferative glomerulonephritis (33.3%) and membranoproliferative glomerulonephritis (44.5%) in animals infected by *Fasciola hepatica*. On DIF, 100% of the animals with fascioliasis had granular and pseudolinear IgG deposits; while 70.4% (19 animals) had this diagnosis on IIF. On the immunohistochemical assay, however, the *Fasciola hepatica* antigen was found in 20 infected animals. Our conclusion is that there is glomerulopathy associated with fascioliasis, and that cattle are suitable as naturally existent experimental model of renal injury by circulating immune complexes.

Keywords: fascioliasis, parasitic diseases, chronic kidney failure, glomerulonephritis

1- Introduction

Liver fluke disease or fascioliasis is an important parasitic disease that affects cattle, sheep, goats, buffaloes, wild animals, and man worldwide. This disease causes remarkable economic losses, great expenses with anthelmintics, in addition to liver condemnation, production loss due to mortality, lower production of meat, milk and wool; reduced weight gain, and impaired fertility, also hampering the selection of animals (Malone, 1986, Saleha, 1991, Dalton, 1999). Renal involvement in parasitic diseases has several clinical manifestations, including hematuria, mild proteinuria, nephrotic syndrome, and chronic kidney failure. Glomerular changes range from mild and transient mesangial proliferation to well-defined glomerulonephritis. In the acute phase of some parasitic diseases such as hydatid disease, trichinosis and leishmaniasis, mesangioproliferative glomerulonephritis is observed, but tends to disappear when the parasitic infection is under control. Deposits of IgG, IgM and C3 suggestive of circulating immune complexes in glomeruli can be observed (Edelweiss and Lizardo-Daudt, 1991; Goldstein, 1992). Glomerulonephritis in chronic parasitic diseases were reported in leishmaniasis, hydatid disease, schistosomiasis, malaria and dirofilariasis (Brito et al., 1975; Oliveira et al., 1985; Sartori et al., 1987; Ramos and Andrade, 1987; Grauer et al. 1989; Edelweiss and Lizardo-Daudt, 1991; Nieto et al., 1992; Goldstein, 1992; Nimri and Lanners, 1994, abstract; Barsoum et al. 1996; Costa et al, 2000; Tafuri et al., 2001; Mathias et al., 2001) The renal injuries caused by parasitic diseases involve nonspecific mechanisms, parasitic migration, and immunological mechanisms. The aim of our

study was to assess glomerulopathy in cattle naturally infected by *Fasciola hepatica* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

2 - Material and Methods

Animals

Tissue specimens were collected from the kidneys of 51 animals, 27 with natural *Fasciola hepatica* infection, and 24 uninfected animals (controls). The cattle belonged to different regions of the State of Rio Grande do Sul, Brazil, and were slaughtered at a meat packing house in compliance with articles 116 and 135, decree no. 30691 as of March 29, 1952, and decree no. 2244 as of June 4, 1977.

Histopathology

Kidney biopsies were fixed in Duboscq-Brasil for 10-12 hours, with post-fixation in 10% formalin, were dehydrated, clarified, embedded in paraffin, cut at a 4- μ m thickness, stained with hematoxylin and eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS), and Masson's trichrome, as described by Meadows (1978).

Direct immunofluorescence (DIF) and indirect immunofluorescence (IIF)

On DIF, frozen kidney biopsies were sectioned in a cryostat at a 4- μ m thickness, and fixed in acetone for five minutes, washed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2, 0.01 M, Laborclin), placed in a moisture chamber for 30 minutes with anti-bovine IgG (whole molecule) FITC conjugate (Sigma- F7887), diluted 1:300 in PBS. The glass slides were washed with PBS three times, and the sections were then mounted

on gelatin-coated slides. On IIF, an FITC-conjugated antihuman IgG (Behring Institut), diluted 1:300 in PBS, was used as secondary antibody.

Immunohistochemical analysis

Kidney biopsies, in paraffin-embedded blocks, were cut at a 4- μ m thickness. The labeled streptavidin biotin (Dako LSAB + Kit Peroxidase, K 0690, CA, USA) method was used. The primary polyclonal rabbit antibody against *Fasciola hepatica* was prepared as described by Cervi et al. (1992) and Espino et al. (2000), diluted 1:100 in PBS. The primary antibody was replaced with PBS in the negative controls. The rabbits were sacrificed in compliance with law 6638 as of May 8, 1979 – Rules for the Scientific Teaching of Animal Vivisection.

3 – Results

Histopathological findings were classified according to the patterns of kidney diseases described by Schwartz (1998) and Cotran et al. (1999), who evaluated glomeruli, renal tubules, vessels, and spaces. Renal changes in response to bovine fascioliasis varied among the studied animals

Table 1 The kidney histopathological diagnosis of cattle infected with *Fasciola hepatica* and control animals

Histopathological distribution	Animals with <i>Fasciola hepatica</i>	Control animals
Membranoproliferative glomerulonephritis	12 (44.5%)	-
Mesangioproliferative glomerulonephritis	9 (33.3%)	1 (4.2%)
Within normal limits	6 (22.2%)	20 (83.3%)
Others	-	3 (12.5%)
Total	27 (100%)	24 (100%)

Of the 27 infected animals, 21 (77.8%) had kidney disease, 12 (44.5%) presented with membranoproliferative glomerulonephritis, 9 (33.3%) had mesangioproliferative glomerulonephritis, and 6 (22.2%) showed normal renal biopsies.

In addition to glomerular changes, renal tubules showed fibrosis, inflammatory cell infiltrate, hyaline and biliary cylinder, and erythrocytes. The histopathological diagnosis of control animals revealed that 20 (83.34%) did not present kidney disease. The renal biopsy 1 (4.2%) of the control group revealed mesangioproliferative glomerulonephritis, and 3 (12.5%) had other alterations compatible with mild acute interstitial nephritis, and mild focal inflammatory cell infiltrate.

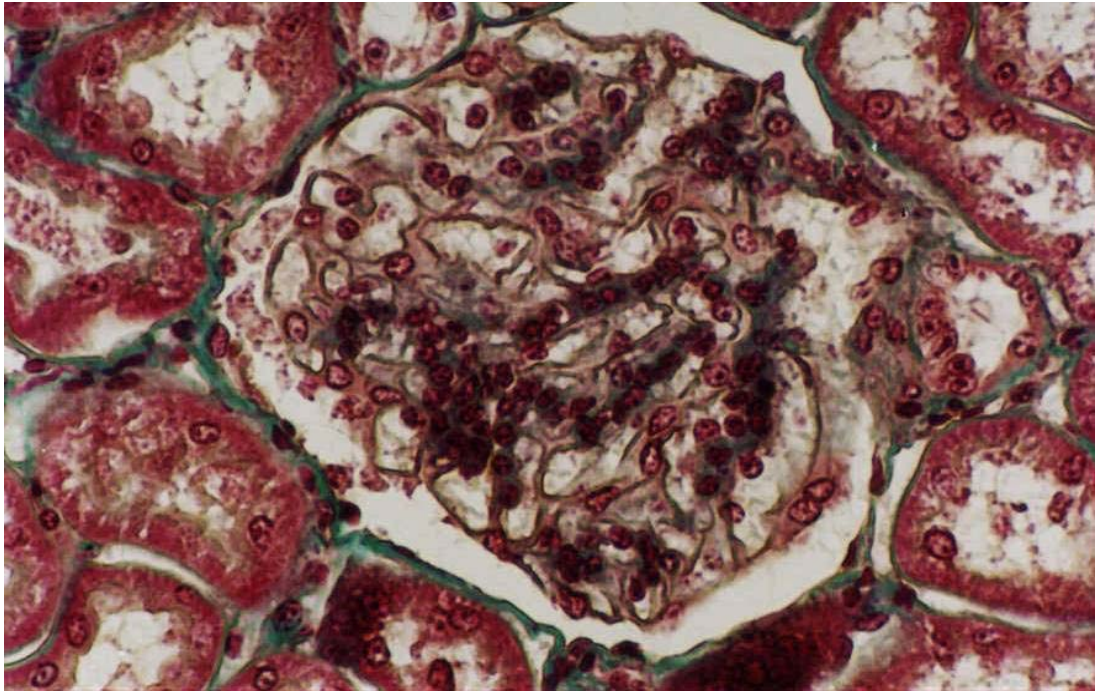


Figure 1. Glomeruli showing membranoproliferative glomerulonephritis, Masson's trichrome; X 400.

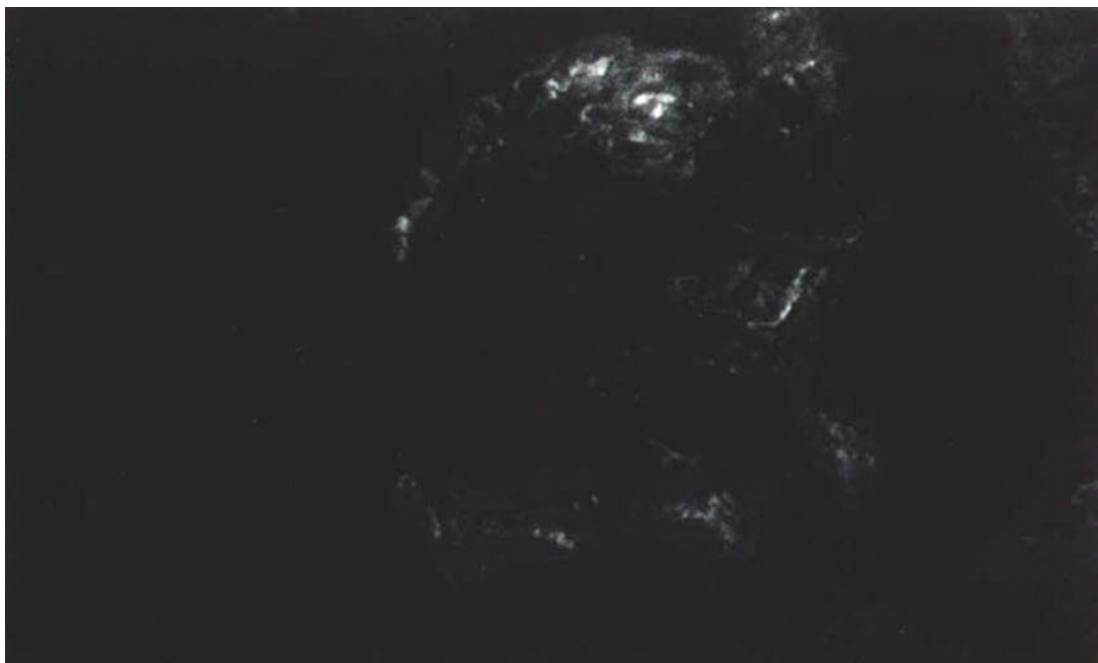


Figure 2. Immunofluorescence microscopy showing granular deposits of IgG in mesangial areas and along some capillary walls; X 400.

DIF was positive in all infected animals. Granular and pseudolinear IgG deposits were found in the mesangial regions of glomeruli. On IIF, the diagnosis was positive in 70.4% of infected animals. DIF and IIF were negative in the control group. The immunohistochemical analysis revealed the presence of diffuse brown antigens of *Fasciola hepatica* in the glomerulus and vascular pole.

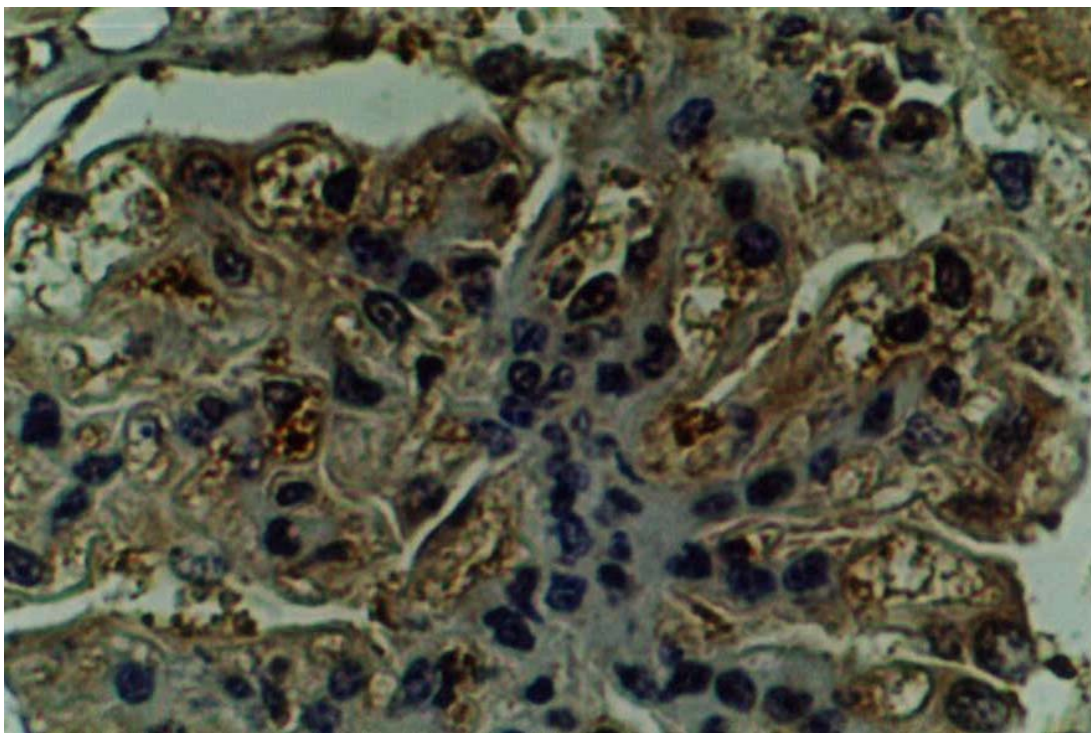


Figure 3. Immunohistochemical technique showing the presence of positive reaction to *Fasciola hepatica* antigens; X 1000.

4 - Discussion

Fascioliasis in ruminants is an important parasitic disease in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, with a prevalence rate of 13.2% (Serra-Freire, 1995 and Müller et al., 1997, abstract), having economic and health consequences. This study shows, for the first time, the relationship between fascioliasis and glomerulonephritis using naturally infected animals as models. There are several forms of glomerular disease in which, with or without complement, immunoglobulins and antigens may be observed and considered to cause renal injury in many pathologies, including parasitic diseases (Jones et al., 1996). Soni and Cox (1975) showed nephritis caused by immune complex in kidneys of chickens infected by *Plasmodium gallinaceum*, and detected granular deposits in the glomerulus, associating glomerulonephritis with acute avian malaria. Valli and Fursberg (1979, abstract) diagnosed membranoproliferative glomerulonephritis in cattle naturally infected by *Trypanosoma congolensis*. Andres and McCluskey (1975) and Andrade and Marck (1984) experimentally infected mice and rabbits with *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* to assess renal injury, and detected granular deposits of immunoglobulins, complement, and antigen in the glomeruli of animals. They concluded that glomerulopathy produced by these parasites was probably mediated by antibodies. Our findings on cattle infected by *Fasciola hepatica* showed the same pattern of renal injury.

Robinson et al (1982) infected rabbits with *Schistosoma japonicum*. In their experiment, 83% of the rabbits presented with glomerulonephritis and IgG deposits in the subendothelial and mesangial regions of glomeruli, 78% had IgM deposits, and

28% presented deposits of C3. Leishmaniasis was investigated by Sartori et al. (1987), who reported mesangioproliferative glomerulonephritis in hamsters infected with *Leishmania donovani*. They identified immunoglobulin and antigen by finding granular deposits in the mesangial region of glomeruli. By assessing renal injury, those authors concluded that glomerulonephritis was associated with immune complex deposition. Mancianti et al. (1989), Poli et al. (1991), and Nieto et al. (1992) observed glomerulonephritis in dogs infected by *Leishmania infantum* and detected immune complex deposits (IgU, IgG, C3) in glomeruli, in the mesangial regions, and along the glomerular and tubular basement membrane. Costa et al. (2000) and Tafuri et al. (2001) studied dogs naturally infected by *Leishmania chagasi* in order to assess glomerular injury. Renal biopsies presented inflammatory cell infiltrate in glomeruli and interstitium, segmental glomerulosclerosis, diffuse membranoproliferative glomerulonephritis, diffuse mesangioproliferative glomerulonephritis, and crescentic glomerulonephritis. The immunohistochemical analysis yielded positive results in the studied dogs. Mathias et al (2001) infected hamsters with *Leishmania chagasi* and detected the presence of IgG deposits, in addition to membranoproliferative and mesangioproliferative glomerulonephritis.

The renal injury caused by leishmaniasis is similar to that of bovine fascioliasis. In addition, the immunohistochemical detection of *Fasciola hepatica* antigen in glomeruli, and the presence of IgG are suggestive of disease mediated by immune complexes. The antigen deposits shown by the streptavidin-peroxidase technique were not present in all infected animals. Similar results were obtained by Costa et al. (2000). Experimental dirofilariasis was studied by Grauer et al. (1987, 1989) with the aim of assessing glomerular injury in dogs. The lesion was characterized by

mesangial proliferation, neutrophil infiltrate, enhancement of the glomerular basement membrane, leukocyte infiltrate, fibrin deposits, and presence of IgG, IgM and C3 deposits with a glomerular pattern, electron-dense deposits in the mesangial, subendothelial and intramembrane regions of glomeruli. Glomerulopathy suggesting immunomediated disease in canine heartworm also indicated immunomediated disease in bovine fascioliasis. The positive results obtained through the immunofluorescent analysis of the renal tissue of cattle with *Fasciola hepatica* is clear evidence of antigen-antibody complexes with a granular and pseudolinear pattern in the mesangial and subendothelial regions.

Edelweiss and Lizard-Daudt (1991) and Goldstein (1992) studied glomerulonephritis in sheep naturally infected by *Echinococcus granulosus* in an endemic region in southern Brazil. They observed membranoproliferative and mesangioproliferative glomerulonephritis, hyaline cylinders, erythrocytes, and antigens compatible with immunomediated disease. Renal involvement associated with parasitic disease was investigated in mice experimentally infected with *Toxocara canis* (Casarosa et al., 1992).

Glomerulonephritis, and granular deposits of IgG, IgM, and C3 suggest the presence of immunomediated mechanisms in the pathogenesis of renal injury in toxocariasis (Casarosa et al., 1992). Nimri and Lanners (1994) detected IgG, C3, C4, albumin and fibrinogen in kidneys of rhesus monkeys infected by *Plasmodium inui*, and suggested that glomerulopathy is associated with that parasitic infection. The absence of renal injury in 6 (22.2%) animals infected by *Fasciola hepatica* may be explained through low parasitic charge, or nutritional and health management. Focal mesangioproliferative glomerulonephritis, without any other renal alterations, was

diagnosed in 1 control animal (4.2%). Biopsies conducted on 3 controls (12.5%) revealed diffuse inflammatory cell infiltrate (grade I) and mild tubular atrophy, with no antigen-antibody complexes, which is possibly related to other pathologies or to sanitation and nutritional status. These findings show, for the first time, the occurrence of renal injury, formation of in situ immune complexes, with pathogenesis of glomerulonephritis partially associated with bovine fascioliasis.

5 - Acknowledgements

We thank the Graduate and Research Program (PPPG) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) for granting us permission to use its Experimental Pathology Laboratory.

6 – References

Andrade, Z.A., Marck, E.V. (1984) Schistosomal glomerular disease (A review). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 499-506.

Andres, G.A., McCluskey, R.T. (1975) Tubular and intesticial renal disease due to immunologic mechanisms. Kidney Intern. 7, 271-289.

Barsoum, R., Nabil, M., Saady, G., Genin, C., Saleh, E., Francis, M., El-Kalioubi, A., Iskander, I., El-Garem, A. (1996) Immunoglobulin-A and the pathogenesis of schistosomal glomerulopathy. Kidney Intern. 50, 920-928.

Brito, T., Hoshino-Shimizu, S., Amato Neto, V., Duarte, I.S., Penna, D.O. (1975) Glomerular involvement in human Kala-azar: a light, immunofluorescent and electron microscopic study based on kidney biopsies. Am. J. of Trop. Med. Hyg. 24, 9-18.

Casarsosa, L., Papini, R., Mancianti, F., Abramo, F., Poli, A. (1992) Renal involvement in mice experimentally infected with *Toxocara canis* embryonated eggs. Vet. Parasit. 42, 265-272.

Cervi, L.A., Rubinstein, H., Masih, D.T. (1992) Serological eletrophoretic and biological properties of *Fasciola hepatica* antigens. Rev. Inst. Med. Trop. São

Paulo. 34, 517-525.

Costa, F. A. L., Guerra, J.L., Silva, S.M.M.S., Klein, R.P., Mendonça, I.L., Goto, H. (2000) CD4+T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. 33, 1455-1458.

Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. (1999) Robbins Pathology Basis of Disease. 6 th., W.B. Saunders Company (Ed.), 1425 p.

Dalton, J.P. (1999) Epidemiology and control . In: Fasciolosis , Dalton JP (Ed.),CABI Publishing, University Press, Cambridge, UK, pp. 113-149.

Edelweiss, M.I.A., Lizardo-Daudt, H. M.. (1991) Naturally existing model of glomerulonephritis mediated by immune complexes associated with hydatidosis in sheep. Nephron, 57, 253-254.

Espino, A.M., Borges, A., Duménigo, B.E. (2000) Coproantigenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. Rev. Panam. Salud Publica, 7, 225-231.

Goldstein, H.F. (1992) Alterações renais em ovelhas com hidatidose: modelo naturalmente existente de glomerulopatia por imunocomplexos. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, FAMED/UFRGS, 53p.

Grauer, G.F., Culham, C.A., Cooley, A.J., Poff, B.C., Oberley, T.D., Brownfield, M.S., Grieve, R.B. (1987) . Clinicopathologic and histologic evaluation of *Dirofilaria immitis*- induced nephropathy in dogs. Am. J. Trop. Med. Hyg., 37, 588-596.

Grauer, G.F., Culham, C.A., Dubielzig, R.R., Longhofer, S.L., Grieve, R.B. (1989) Experimental *Dirofilaria immitis*-associated glomerulonephritis induced in part by in situ formation of immune complexes in the glomerular capillary wall. J.Parasit., 75, 585-593.

Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W.. 1996. Immunopathology. In: Veterinary Pathology, cap. 7, 6th.ed., Williams & Wilkins (ed), Baltimore, pp. 177-196.

Malone, Jr., J.B. (1986) Fascioliasis and cestodiasis in cattle. Vet. Clinics of North America Food Animal Practice, 2, 261-275.

Mancianti, F., Poli, A., Bionda, A. (1989) Analysis of renal immune deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. Parasitologia 31, 213-230.

Mathias, R., Costa, F.A.L., Goto, H. (2001) Detection of immunoglobulin G in the lung and the liver of hamster with visceral leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res., 34, 539-543.

Meadows, R. (1978) Renal histopathology. A light, electron and immunofluorescent microscopic study of renal disease. Oxford Medical Publications (ed), 2 ed., Oxford University Press, Oxford, 544 p.

Nieto, C.G., Navarrete, I., Habela, M.A., Serrano, F., Redondo, E..(1992)
Pathological changes in kidneys of dogs with natural leishmania infection. Vet. Parasit., 45, 33-47.

Oliveira, A . V., Roque- Barreira, M. C., Sartori, A , Campos-Neto, A ., Rosse, M. A . (1985) Mesangial proliferative glomerulonephritis associated with progressive amyloid deposition in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. American J. of Pathology, 120: 256-262.

Poli, A., Abramo, F., Mancianti, F., Nigro, M., Pieri, S., Bionda, A. (1991) Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. Nephron , 57, 444-452.

Ramos, E A.G., Andrade, Z.A. (1987) Chronic glomerulonephritis associated with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 29, 162-167.

Robinson, A., Lewert, R.M., Spargo, B.H. (1982) Immune complex glomerulonephritis and amyloidosis in *Schistosoma japonicum* infected rabbits. Trans. R. Soc. Trp. Med. Hyg., 76, 214-226.

Saleha, A .A. (1991) Liver fluke disease (fascioliasis): epidemiology, economic impact and public health significance. Southeast Asian J. Tropic. Med. Public Health, v. 22 (suppl.), p. 361-364.

Sartori, A., Oliveira, A.V.de, Roque-Barreira, M.C., Rossi, M.A., Campos-Neto, A. (1987) Immune complex glomerulonephritis in experimental Kala-azar Parasite Immunol., 9, 93-103.

Schwartz, M.M. (1998) The pathologic diagnosis of renal disease. cap.5. In: Heptinstall's pathology of the kidney, 5 ed., Jennette, J.C., Olson, J.L., Schwartz, M.M. , Silva, F.G., Lippincott-Raven Publishers (ed), Philadelphia, USA, pp.169-180.

Serra-Freire, N.M. da. (1995) Fasciolose hepática. A Hora Veterinária, ed.extra, 1, 13-18.

Soni, J.L., Cox, H.W. (1975) Pathogenesis of acute avian malaria. IV. Immunologic factors in nephritis of acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24, 431-438.

Tafuri, W.L., Oliveira, M.R. de, Melo, M.N., Tafuri, W.L. (2001). Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet. Parasit., 96, 203-212.

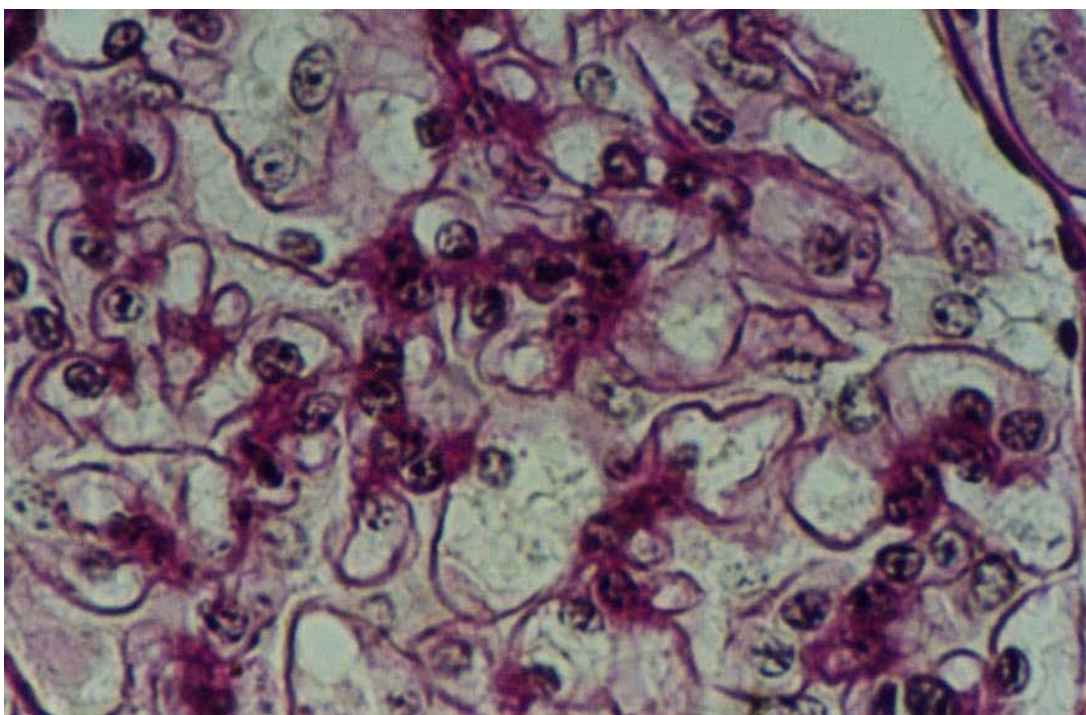


FIGURA 2. Glomerulonefrite membranoproliferativa. Bovino. 1000 X. PAS.

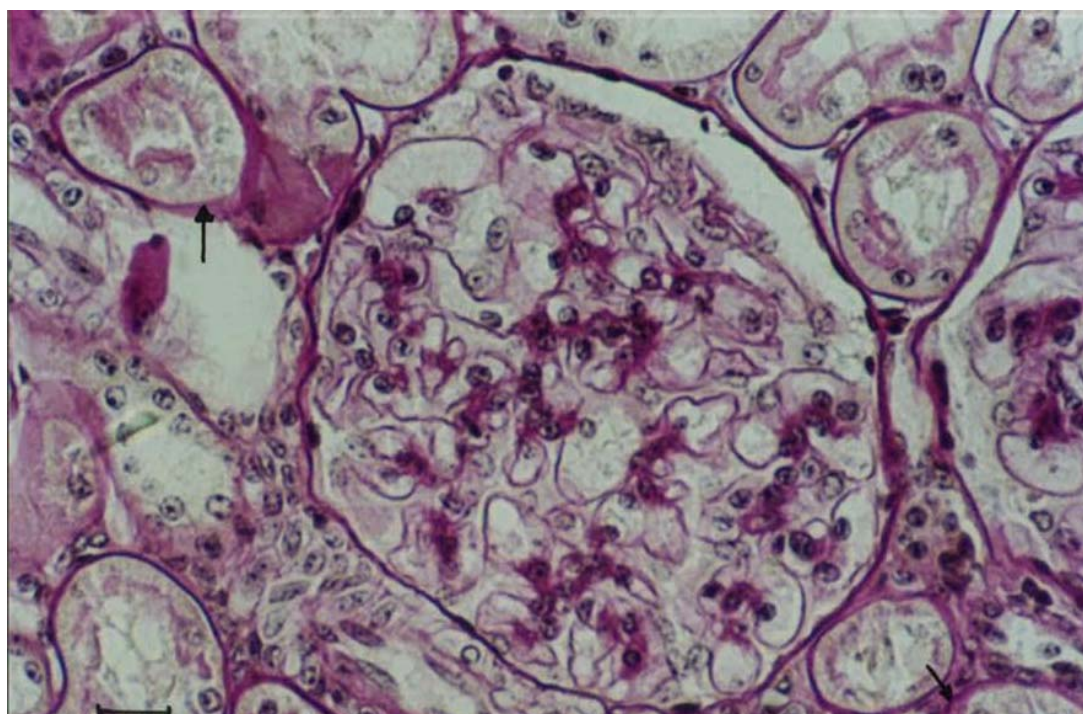


FIGURA 3. Glomerulonefrite membranoproliferativa. Fibrose tubular (setas).Bovino. 400 X. PAS.

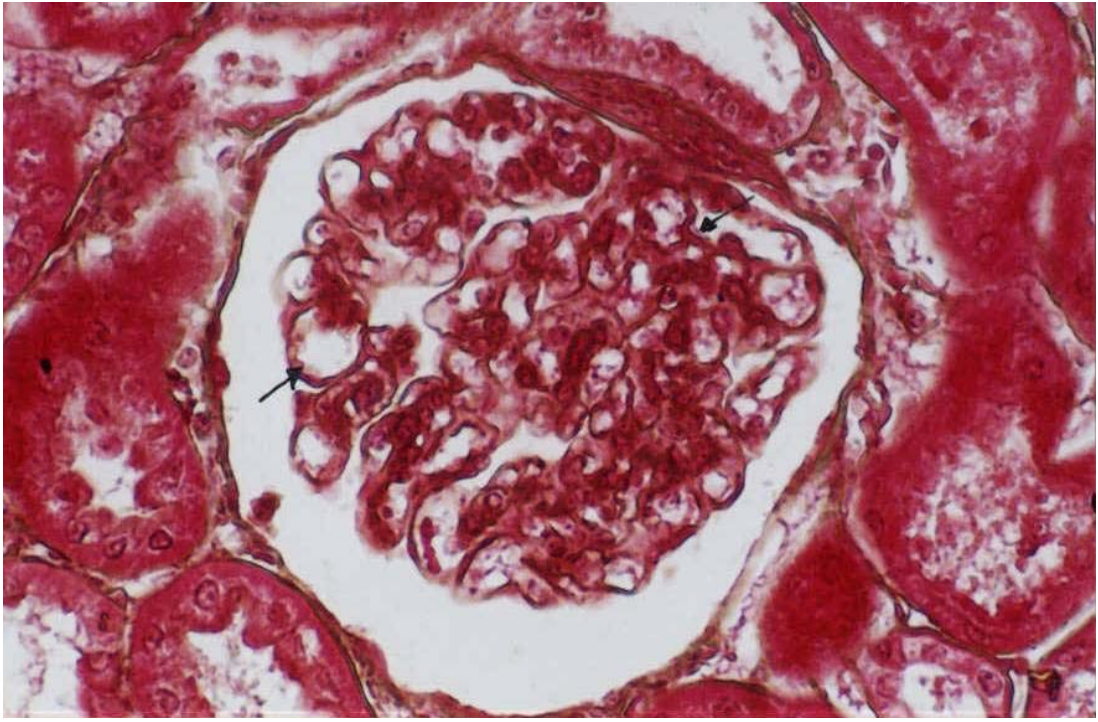


FIGURA 4. Glomerulonefrite membranoproliferativa (setas).Bovino. 400 X. Tricrômico de Masson.

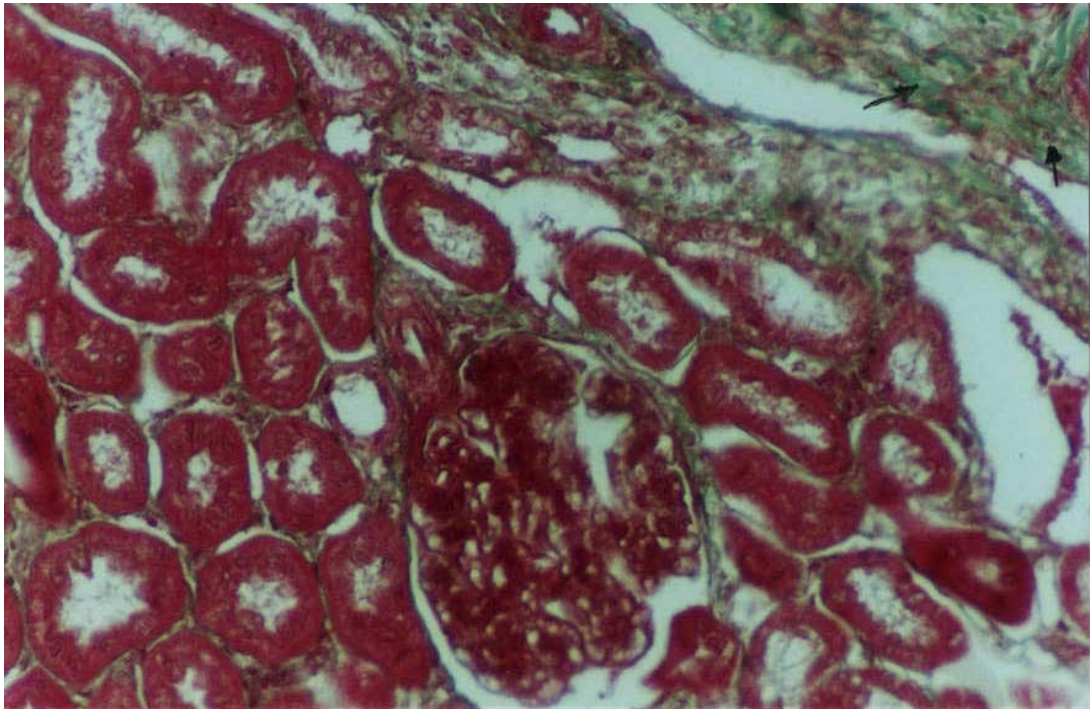


FIGURA 5. Glomerulonefrite membranoproliferativa. Fibrose intersticial (setas).Bovino.200 X. Tricrômico de Masson.

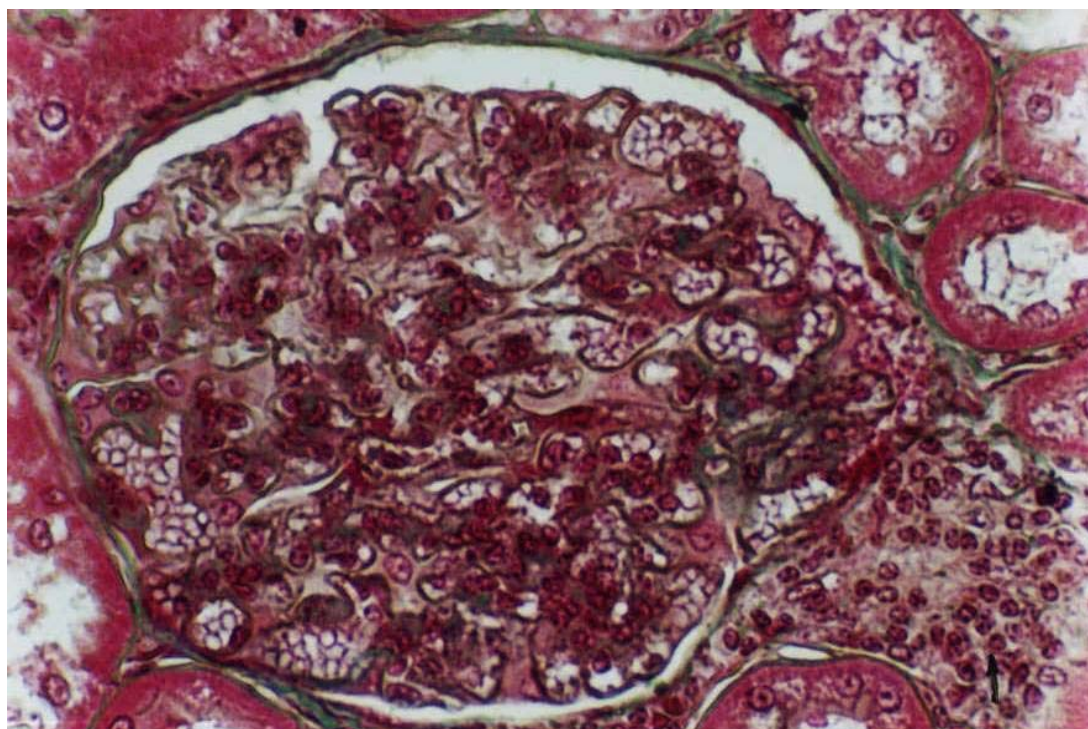


FIGURA 6. Proliferação de células mesangiais e engrossamento da matriz mesangial. Infiltrado inflamatório periglomerular (seta) e áreas de fibrose. Bovino. 400 X. Tricrômico de Masson.

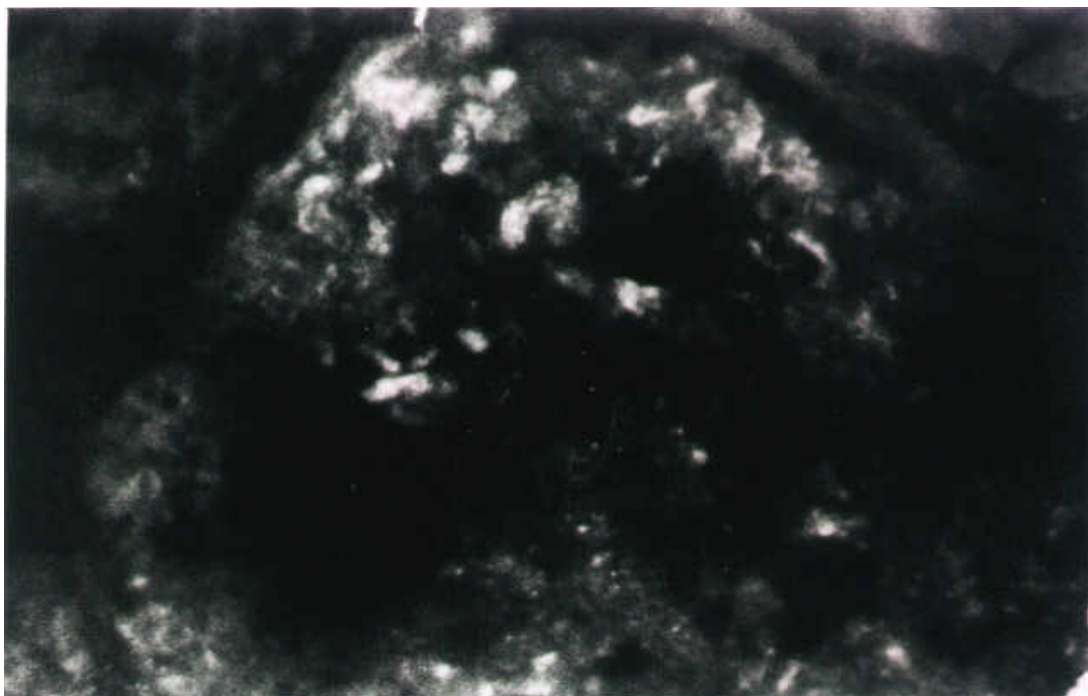


FIGURA 7. Imunofluorescência em biópsia renal de bovino. Depósitos granulares e pseudolineares de IgG nas áreas mesangiais e na parede capilar glomerular (setas). 400 X.



FIGURA 8. Imunofluorescência em biópsia renal de bovino. Depósitos de IgG granular e pseudolinear nas áreas mesangiais e ao longo da parede capilar glomerular (setas). 400 X.

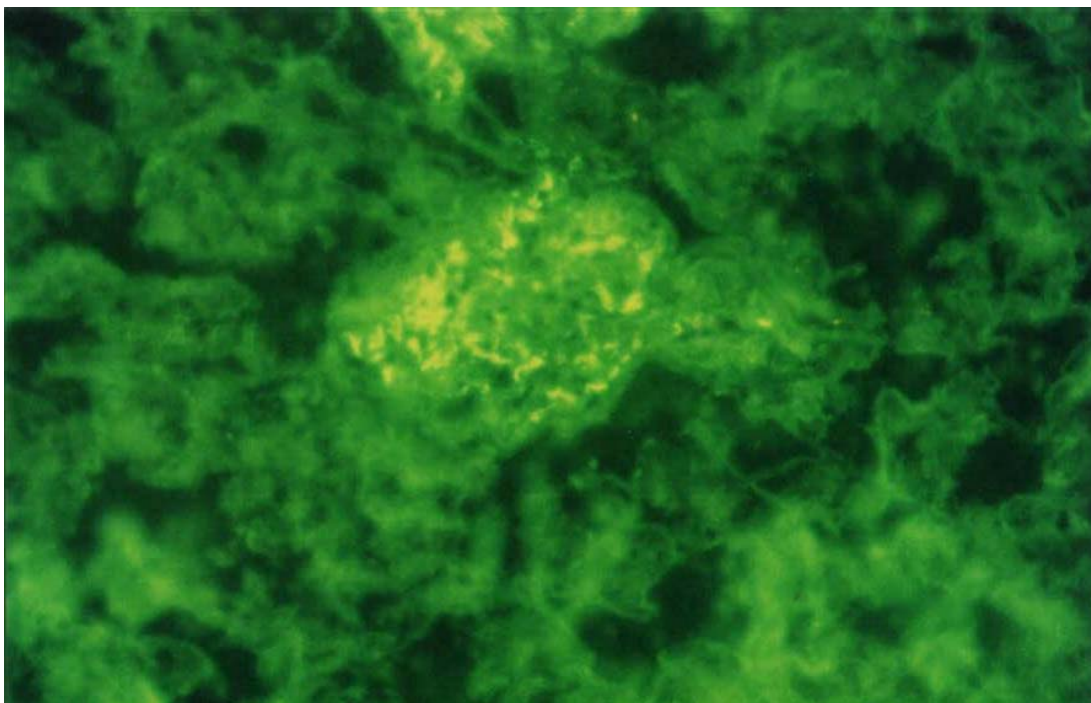


FIGURA 9. Imunofluorescência em biópsia renal de bovino. Depósitos granulares e pseudolineares de IgG no glomérulo (seta). 200 X.

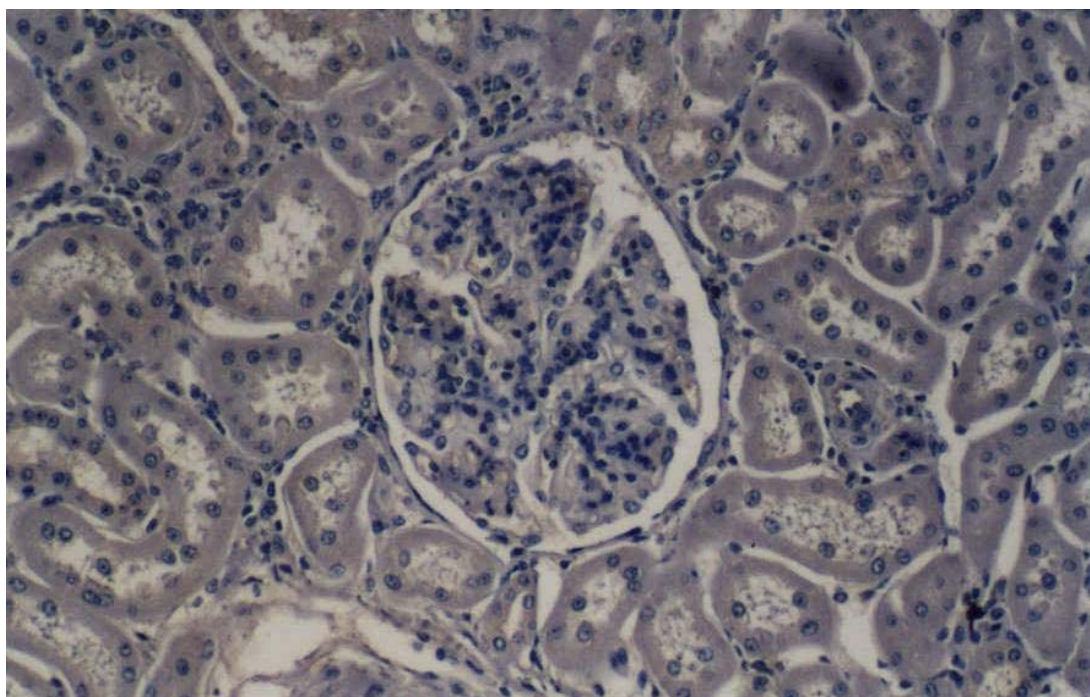


FIGURA 10. Imunoistoquímica em biópsia renal de bovino. Reação negativa. 200 X.

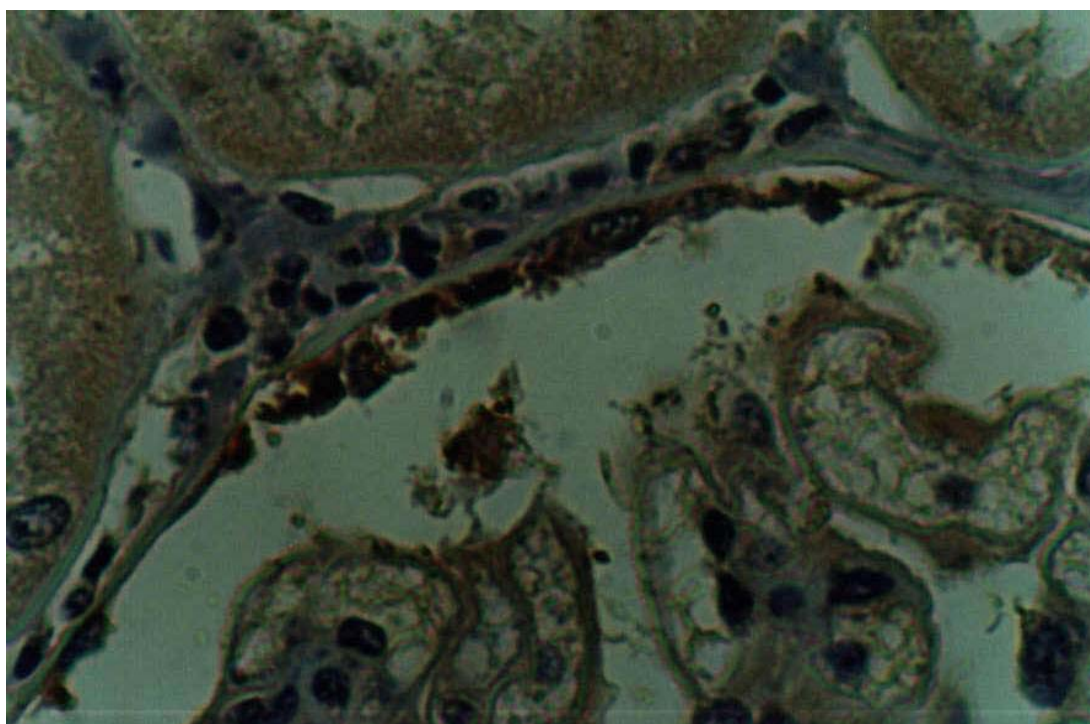


FIGURA 11. Imunoistoquímica em biópsia renal de bovino. Reação positiva com antígeno de cor marrom no glomérulo (setas). 1000 X.

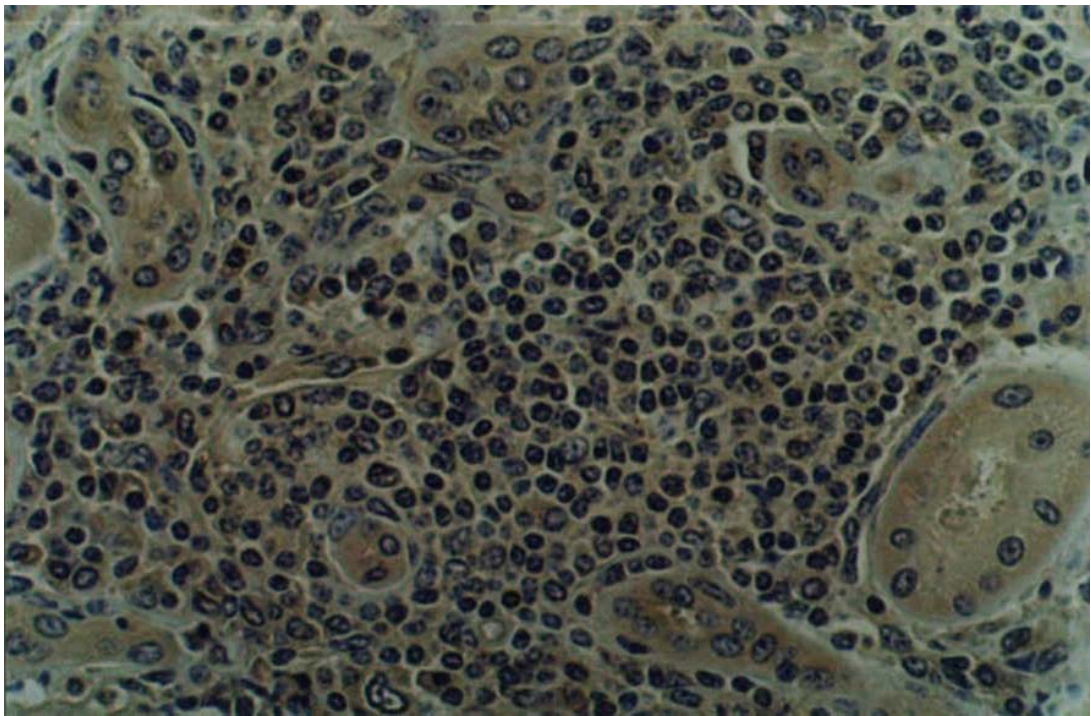


FIGURA 12. Imunoistoquímica em biópsia renal de bovino. Infiltrado inflamatório focal intersticial (setas). 400 X.

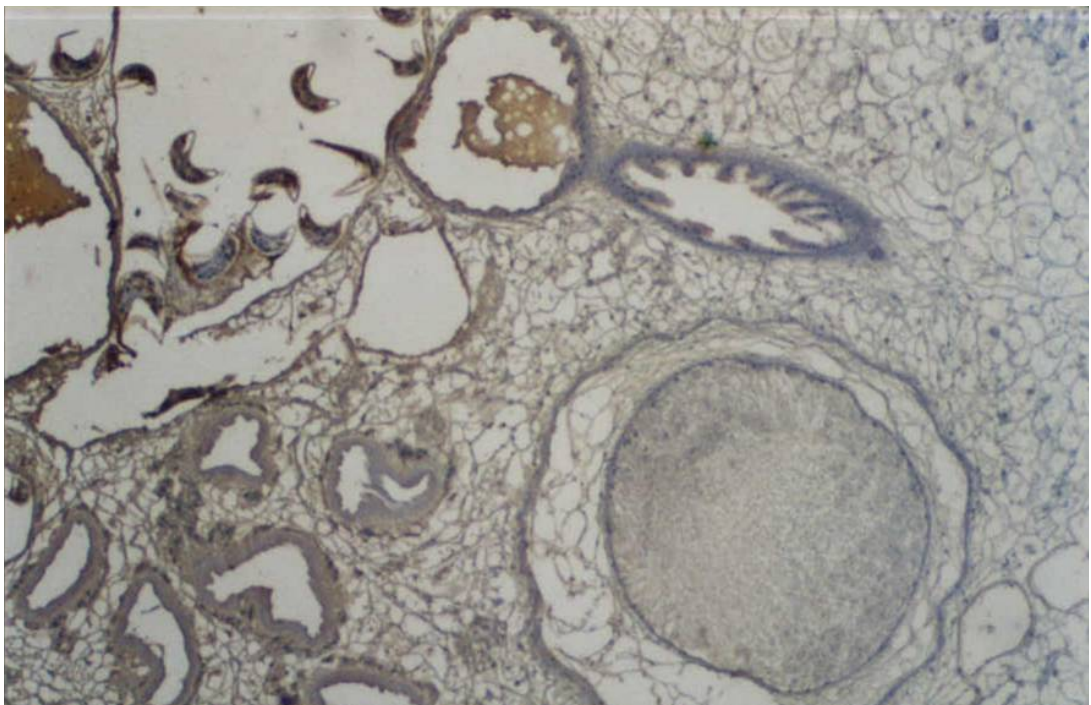


FIGURA 13. Imunoistoquímica em corte histológico de *Fasciola hepática*. Antígenos parasitários de cor marrom (setas). 400 X.

7. ARTIGO 4

No artigo quatro, “Glomerulonephritis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) naturally infected by *Fasciola hepatica*” está demonstrado, através das técnicas de histopatologia, imunofluorescência direta e indireta e imunoistoquímica, glomerulonefrite e sua correlação com o dano renal mediado por complexos imunes decorrentes da reação de hipersensibilidade tipo III.

Neste experimento foram utilizados 11 búfalos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica* e 9 búfalos não infectados, como controle.

As biópsias renais foram processadas para microscopia óptica, microscopia de imunofluorescência e imunohistoquímica.

Para o diagnóstico histopatológico, as classificações do padrão de doença renal, com avaliação de glomérulos, túbulos renais e alterações intersticiais, foram descritas por Churg *et al.* (1995) e Cotran *et al.* (1999).

As colorações utilizadas foram Hematoxilina e Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Tricrômico de Masson (TV). Para a imunofluorescência direta o anticorpo utilizado foi a anti-IgG bovino marcado para o antígeno específico; e para a imunofluorescência indireta, o anti-IgG bovino e o anti-IgG humano. O soro hiperimune anti-*Fasciola hepatica* utilizado na técnica de imunoistoquímica foi produzido em coelhos.

As biópsias de 7 búfalos parasitados (63,6%) revelaram glomerulonefrite membranoproliferativa (Figuras 16 e 18) e de 3 (27,3%) glomerulonefrite mesangioproliferativa (Figuras 15 e 17), com total de 90,6%. As técnicas de imunofluorescência e imunoistoquímica revelaram a presença de complexos imunes

específicos da *Fasciola hepatica*. Depósitos de complexos imunes mostraram padrão granular e pseudolinear nas regiões mesangiais e subendoteliais do glomérulo (Figuras 19, 20, 21, 23, 24,).

A presença de glomerulonefrite decorrente de parasitose foi descrita por Soni e Cox (1975), Grauer *et al.* (1987), Sartori *et al.* (1987), Grauer *et al.* (1989), Edelweiss e Lizardo-Daudt (1991), Poli *et al.* (1991), Nieto *et al.* (1992), Goldstein (1992), Costa *et al.* (2000), Mathias *et al.* (2001) e Tafuri *et al.* (2001).

Dos 9 búfalos do grupo controle, 7 (77,8%) não apresentaram lesão renal microscópica e 1 búfalo (11,1%) diagnosticado com glomerulonefrite membranoproliferativa e outro (11,1%) com mesangioproliferativa. A pesquisa de antígeno e anticorpo, através de imunofluorescência e imunoistoquímica não revelou a presença de complexos imunes (Figura 22), portanto o achado de alteração renal em dois bovinos (22,2%) indica a associação com outra etiologia.

Os resultados apresentados demonstram, pela primeira vez, que o dano renal, representado pela glomerulonefrite em búfalos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*, resultou da deposição de complexos imunes circulantes no rim em resposta à presença do parasito.

Glomerulonephritis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) naturally infected by *Fasciola hepatica*

Sandra Márcia Tietz Marques¹; Maria Lúcia Scroferneker²; Maria Isabel Albano Edelweiss³

Corresponding author:

Dr. Maria Lúcia Scroferneker

Rua Vasco da Gama, 176/604

CEP 90040-111

Porto Alegre / RS - Brazil

Tel.: +55 51 3311 0685

Fax: +55 51 3316 3155

e-mail: scrofern@vortex.ufrgs.br

santietz@zipmail.com.br

¹ Veterinarian doctor and graduate student, Escola Agrotécnica Federal de Concórdia, EAFC, Km 108, Concórdia, Santa Catarina, Brasil, CEP: 89700-000. Tel. + 55 49 4449090.

² Professor, Department of Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Vasco da Gama 176/604, Porto Alegre, Brasil, CEP 90040-111. Tel.: +55 51 3311 0685.

³ Professor, Department of Pathology, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 1954/ 702, Porto Alegre, RS. CEP: 90035-002 Tel-Fax: + 55 51 3330 7030.

Abstract

Glomerulonephritis caused by *Fasciola hepatica* was observed in buffaloes. Renal biopsies of 20 buffaloes, 11 with *Fasciola hepatica* and 9 uninfected buffaloes (controls), were examined by light microscopy, direct and indirect immunofluorescence, and immunohistochemical analysis. The biopsies of seven (63.6%) infected buffaloes revealed membranoproliferative glomerulonephritis, three biopsies (27.3%) showed mesangioproliferative glomerulonephritis, and one kidney presented normal biopsy specimens. In the control group, seven buffaloes (77.8%) presented normal biopsy specimens, while two (22.2%) revealed glomerulonephritis - one with a membranoproliferative pattern, and the other with a mesangioproliferative pattern - with extensive inflammatory cell infiltrate. Our conclusion is that glomerulopathy is associated with fascioliasis and that buffaloes are suitable as naturally existent experimental model of renal injury by circulating immune complexes.

Keywords: glomerulopathy; immunofluorescence; immunohistochemistry; fascioliasis; renal injury

Introduction

Fasciola hepatica is a trematode that infects the liver parenchyma and bile ducts of ruminants and other mammals, usually occurring as subclinical infection, causing significant economic losses, such as condemnation of fluke-infected livers, mortality, lower production of meat, milk, and wool, reduced weight gain, and impaired fertility (Dalton, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000). Liver fluke infection in buffaloes is endemic in many regions around the world (Qiu and Leo, 1995). In the southern and southeastern regions of Brazil, bovine fascioliasis is endemic; however, fascioliasis in buffaloes occurs from time to time (Serra-Freire, 1995; Muller *et al.*, 1997) in the 300,000 to 400,000 buffaloes in the state of Rio Grande do Sul. Luz *et al.* (1992) reported a prevalence rate of 19.8% for fascioliasis in buffaloes in the state of Paraná. Glomerulonephritis (GN) immunomediated by animal parasitic diseases was reported in leishmaniasis, hydatid disease, malaria, and dirofilariasis (Soni and Cox, 1975; Grauer *et al.*, 1987; Sartori *et al.*, 1987; Grauer *et al.*, 1989; Edelweiss and Lizardo-Daudt, 1991; Poli *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 1992; Goldstein, 1992; Costa *et al.*, 2000; Mathias *et al.*, 2001; Tafuri *et al.*, 2001). Glomerulonephritis induced by immune complexes was reported in cattle naturally infected by *Trypanosoma congolensis* (Valli and Fursberg, 1979). In rabbits infected by *Schistosoma japonicum*, 83% had GN and IgG deposits in the subendothelial and mesangial regions of glomeruli, 78% presented IgM and 28% revealed C3 in the glomerulus (Robinson *et al.*, 1982). Leishmaniasis also causes renal injury, characterized by GN and the presence of immunoglobulin (IgG, IgM and C3) deposits in the mesangial regions and along the glomerular and tubular basement membranes in infected

animals (Sartori et al., 1987, Mancianti et al., 1989, Poli et al., 1991, Nieto et al., 1992). GN observed in leishmaniasis led those authors to conclude that renal injury was associated with immune complex deposits. Costa et al. (2000), Tafuri et al. (2001) and Mathias et al. (2001) diagnosed the same GN pattern induced by leishmaniasis and by the presence of parasite antigens and antibodies. The renal injuries caused by the parasites involve nonspecific mechanisms, parasitic migration, and immunological mechanisms. The aim of this study is to assess the presence of glomerulopathy in buffaloes naturally infected by *Fasciola hepatica* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, through histopathological and immunological findings.

Materials and methods

Animals

As our objective was to detect *Fasciola hepatica*, we selected eleven infected buffaloes, and used nine buffaloes as control. The twenty selected animals were slaughtered at a meat packing house, in the state of Rio Grande do Sul.

The livers of infected animals used in the experiment had been rejected by the Federal Meat Inspection Service and were carefully removed at necropsy. The major bile ducts were cut open and examined carefully for the presence of *Fasciola hepatica*; the liver parenchyma was sliced longitudinally into 2 cm sections, and the flukes were recovered and fixed in 10% buffered formalin. The worm burdens ranged between one and 30 adult flukes.

The livers of these animals were condemned if they showed thickening of bile ducts, atrophy, spots, impaired liver tissue, fibrosis, obstructed hepatic ducts, hepatic calcareous granulomas, cirrhosis and/or abnormal liver parenchyma.

All positive animals to *Fasciola hepatica* were naturally infected and provided from endemic regions in the state of Rio Grande do Sul. The negative control animals were provided from non-endemic regions, and did not present any other pathologies.

Histopathology

Routine necropsy was performed and the kidneys were removed. Two cores of kidney tissue were obtained from the lower pole of both kidneys (Sobh *et al.*, 1990).

Kidney biopsies were fixed in Duboscq-Brasil for 10-12 hours, with post-fixation in 10% formalin, were dehydrated, clarified, embedded in paraffin, cut at a 4- μ m thickness, stained with hematoxylin and eosin (HE), whose preparation is hard to surpass for the amount of general information it gives; periodic acid-Schiff (PAS), which gives a lot of information about renal morphology, especially about the basement membranes and the glomerular mesangium; or Masson's trichrome, which shows fibrotic areas, collagen fibers and blood cells (Meadows, 1978).

Direct immunofluorescence (DIF) and indirect immunofluorescence (IIF)

Frozen kidney biopsies were sectioned in a cryostat at a 4- μ m thickness, and fixed in acetone for five minutes, washed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2, 0.01 M, Laborclin), placed in a moisture chamber for 30 minutes with anti-bovine IgG (whole molecule) FITC conjugate (Sigma- F7887), diluted 1:300 in PBS. The glass slides were washed with PBS three times, and the sections were then mounted on gelatin-coated slides. On IIF, an FITC-conjugated antihuman IgG (Behring Institut), diluted 1:300 in PBS, was used as secondary antibody.

The immunofluorescence technique was used to show the correlation between fascioliasis and the presence of the specific antigen or antibody. On DIF, the marked antibody was used to detect the antigen, while on IIF, the antigen was treated with the unmarked antibody, forming the antigen-antibody complex, which was treated with the marked antibody.

Immunohistochemical analysis

Kidney biopsies, in paraffin-embedded blocks, were cut at a 4- μ m thickness. The labeled streptavidin biotin (Dako LSAB + Kit Peroxidase, K 0690, CA, USA) method was used to detect the *Fasciola hepatica* antigen. The primary polyclonal rabbit antibody against *Fasciola hepatica* was prepared as described by Cervi et al. (1992) and Espino et al. (2000), diluted 1:100 in PBS. The primary antibody was replaced with PBS in the negative controls. The serum from non-immunized rabbits was used as control.

The rabbits were killed in compliance with law 6638 as of May 8, 1979 – Rules for the Scientific Teaching of Animal Vivisection.

Results

Histopathological findings were classified according to the patterns of kidney diseases described by Chung *et al.* (1995) and Cotran *et al.* (1999), who evaluated glomeruli, renal tubules, vessels, and interstitial spaces. Renal changes in response to fascioliasis in buffaloes varied among the studied animals (Table 1).

Table 1 – Histopathological diagnosis of buffaloes infected with *Fasciola hepatica* and control buffaloes.

Histopathological distribution	Buffaloes with <i>Fasciola hepatica</i>	Control buffaloes
Membranoproliferative glomerulonephritis	7 (63.6%)	1 (11.1%)
Mesangioproliferative glomerulonephritis	3 (27.3%)	1 (11.1%)
No lesion	1 (9.1%)	7 (77.8%)
Total	11 (100%)	9 (100%)

Infected buffaloes (Table 1) showed both mesangioproliferative (Figure 1) and membranoproliferative glomerulonephritis (Figure 2). Two buffaloes in the control group (22.2%) presented glomerulonephritis with inflammatory cell infiltrate; however, both the immunofluorescence and the immunohistochemical analysis were negative. The renal damage observed in these animals must have been probably caused by the ingestion of a toxic plant. The immunofluorescence test revealed IgG in the kidneys of buffaloes infected with *Fasciola hepatica*. Granular and pseudolinear IgG deposits were found in the mesangial regions of glomeruli

(Figure3). The immunohistochemical analysis revealed the presence of diffuse brown antigens of *Fasciola hepatica* in the glomerulus (Figure 4).

The histological, immunofluorescence and immunohistochemical techniques showed the correlation between kidney disease and fascioliasis by pointing out a specific reaction between the *Fasciola hepatica* antigen and the antibody.

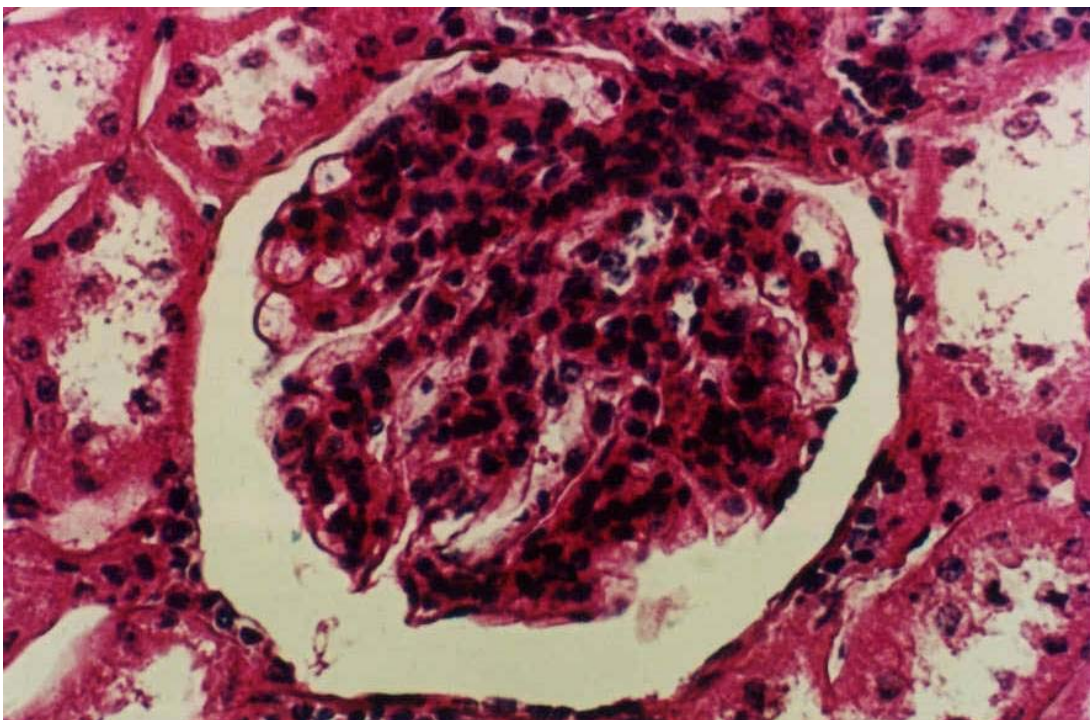


Figure 1. Glomeruli showing proliferation of mesangial cells. HE staining. X40.

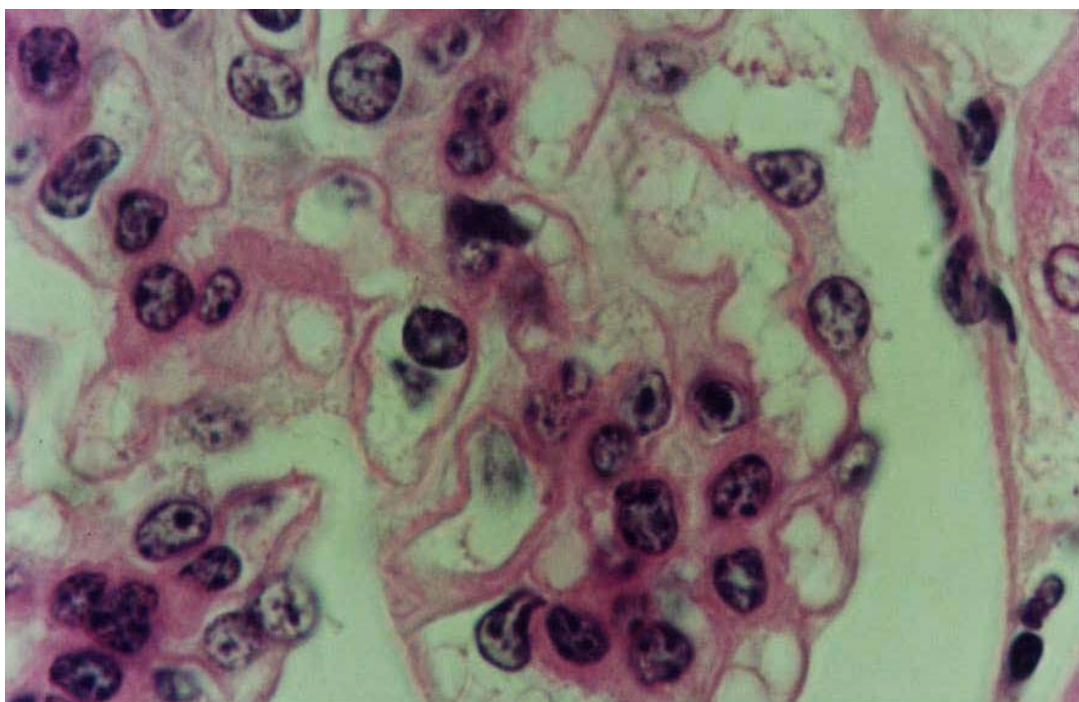


Figure 2. Membranoproliferative GN with thickening of capillary walls. X40.

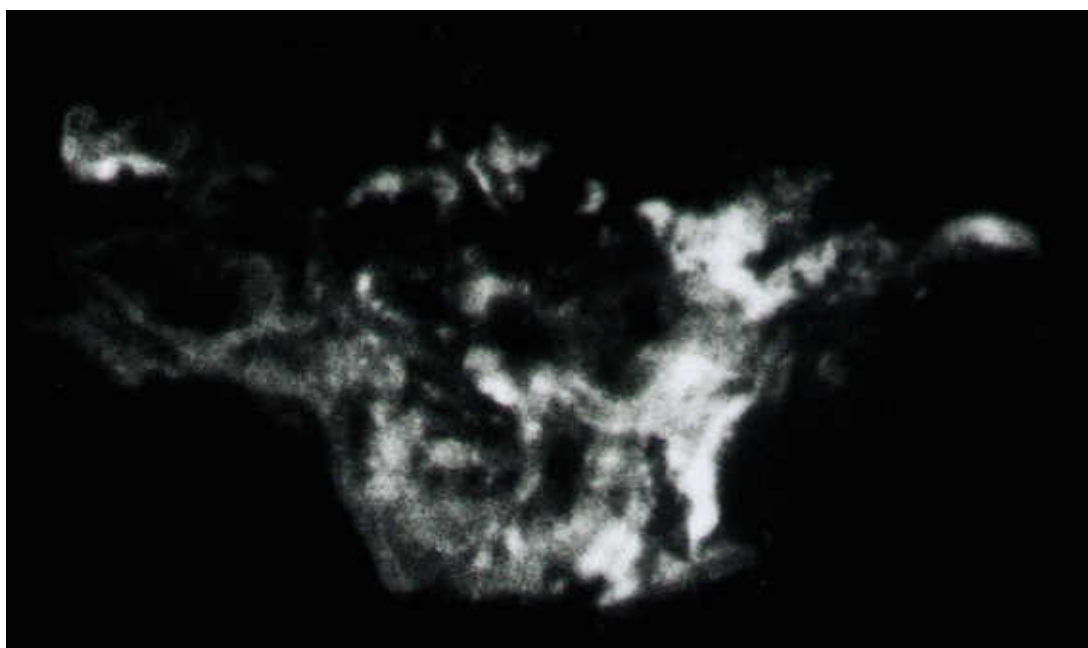


Figure 3. Immunofluorescence test showing granular and pseudolinear IgG deposits of glomeruli. X 40.

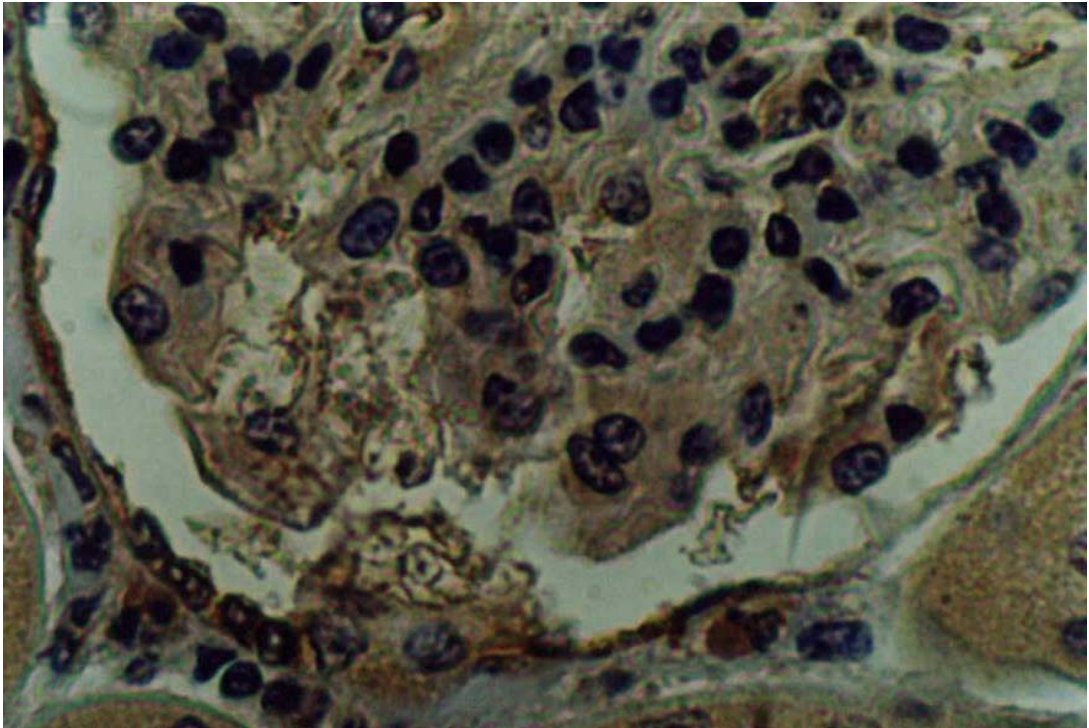


Figure 4. Immunohistochemical analysis with streptavidin biotin method showing the presence of *Fasciola hepatica* antigen (arrows) in glomeruli. X100.

Discussion

Fascioliasis in ruminants is an important parasitic disease in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, having economic and health consequences. Our study of glomerulonephritis (GN) in buffaloes naturally infected by *Fasciola hepatica* confirms that the involvement of glomerulopathy with this parasitic infection is probably mediated by immune complex deposits. The presence of circulating IgG in the course of subclinical fascioliasis reflects host response to the parasite antigens released during *Fasciola hepatica* infection (Ferre *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 2000). Parasite antigen complexes may deposit in renal tissue, causing tissue injury, and may be detected by immunological tests and by the presence of antigen-antibody complex deposits in the renal tissue (Jones *et al.*, 1996, Roitt *et al.*, 1997, Cattell and Jennette, 1998).

The renal injury reported in the present study is similar to that reported by Costa *et al.* (2000), Tafuri *et al.* (2001) and Mathias *et al.* (2001) in leishmaniasis, suggesting the participation of immune complexes in the pathogenesis of glomerulonephritis in the Infected buffaloes.

The antigen of *Fasciola hepatica* identified by the streptavidin-peroxidase method was not present in all infected buffaloes. Costa *et al.* (2000) did not obtain a 100% correlation between the disease and the antigen presentation of *Leishmania chagasi* by using the same method.

Grauer *et al.* (1987, 1989) diagnosed GN characterized by mesangial cell proliferation, neutrophil infiltration, enlargement of the glomerular basement membrane, leukocyte infiltration, fibrin and IgG, IgM and C3 deposits, and parasite

antigen in dirofilariasis in dogs. Glomerulopathy suggestive of immune complex disease in dirofilariasis was also observed in buffaloes infected by fascioliasis.

The positive results obtained from the immunofluorescence analysis of renal tissue of infected buffaloes revealed the presence of antibodies and antigens (granular and pseudolinear pattern in the mesangial and subendothelial regions). As with dirofilariasis, the antigen was detected by the immunohistochemical analysis.

The effects of hydatid disease (*Echinococcus granulosus*) on glomeruli of naturally infected sheep were studied by Edelweiss and Lizardo-Daudt (1991) and Goldstein (1992). Membranoproliferative and mesangioproliferative GN, as well as the antigen, were observed in kidney biopsies, and were compatible with GN mediated by immune complexes secondary to hydatid disease.

Rhesus monkeys infected by *Plasmodium inui* presented IgG, C3, C4, albumin and fibrinogen in their kidneys, suggesting that the pathogenesis of renal injury was associated with malarial disease (Nimri and Lanners, 1994) mediated by the immune mechanism.

GN and the presence of inflammatory cell infiltrate were diagnosed in two uninfected buffaloes (22.2%), without the presence of antigen, which indicates a possible association with another disease.

Conclusion

We concluded that the renal injury observed in our study with buffaloes naturally infected by *Fasciola hepatica* results from the deposition of circulating immune complexes in response to the presence of the parasite.

Further studies about the immunopathogenic mechanism and the participation of other immune system components in fascioliasis of ruminants still have to be carried out.

Acknowledgement

We thank the Graduate and Research Program (PPPG) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) for granting us permission to use its Experimental Pathology Laboratory.

References

Cattell, V., Jennette, J.C., 1998. Mechanisms of acute inflammatory and immunologic renal injury. Heptinstall's Pathology of the Kidney, 5.ed., J.C. Jennette, J.L. Olson, M.M. Schwartz and F.G. Silva, Lippincot-Raven Publishers, Chapter 3, pp. 85-136.

Cervi, L. A. Rubinstein, H., Masih, D.T. 1992. Serological, electrophoretic and biological properties of *Fasciola hepatica* antigens. *Ver. Inst. Med. Trop.* 34 (6), 517-525.

Chen, L., Dauschies, A., Wang, B., Mao, X., 2000. Blood eicosanoids and immune indices during fascioliasis in water buffaloes. *Vet. Paras.* 49, 273-278.

Churg, J., Bernstein, J., Glassock, R. J.. 1995. Renal disease: classification and atlas of glomerular diseases. 2nd edn. Igaku-Shoin Medical Publishers, New York, pp. 231-251.

Costa, F. A. L.; Guerra, J.L.; Silva, S.M.M.S.; Klein, R.P.; Mendonça, I.L.; Goto, H, 2000. CD4⁺T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 1455-1458.

Cotran , R.S., Kumar, V., Collins,T..1999. Robbins Pathology Basis of Disease. , 6th edn., W.B. Saunders Company (Ed.) 1,425 pp.

Dalton J. P, 1999. Epidemiology and control. In: Fascioliasis, Dalton JP (Ed.), CABI Publishing, University Press, Cambridge, UK, pp. 113-149.

Edelweiss, M.I.A., Lizardo-Daudt, H.M, 1991. Naturally existing model of glomerulonephritis mediated by immune complexes associated with hydatidosis in sheep. *Nephron*. 57, 253-254.

Espino A . M., Borges, A ., Duménigo, B.E, 2000. Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. *Revista Panam. Salud Pública*. 7, 225-231.

Ferre , I., Ortega-Mora, L. M., Hojo-Vázquez, F. A, 1997. Serum and bile antibody response (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet. Parasit*. 68, 261-267

Goldstein , H.F, 1992. Alterações renais em ovelhas com hidatidose: modelo naturalmente existente de glomerulopatia por imunocomplexos. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, FAMED/UFRGS, 53 pp.

Grauer, G.F., Culham, C. A., Cooley, A . J., Poff, B. C., Oberley, T. D., Brownfield, M. S., Grieve, R.B., 1987. Clinicopathologic and histologic evaluation of *Dirofilaria immitis*-induced nephropathy in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 588-596.

Grauer, G.F., Culham, C. A., Dubielzig, R. R., Longhofer, S.L., Grieve, R.B., 1989. Experimental *Dirofilaria immitis* –associated glomerulonephritis induced in part by in situ formation of immune complexes in the glomerular capillary wall. *J. Parasit.* 75,585-593.

Jiang, S. X., Bayón, J.E., Ferre, I.; Mao, X. Z., González-Gallego, J., 2000. Effect of experimental fascioliasis on antipyrine metabolism and clearance in water buffaloes. *Vet.Parasit.*88,177-186.

Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W., 1996. *Veterinary Pathology*, Chapter.7, 6th edn., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 177-191

Luz , E., Gazda, C.M., Yada, R.S., 1992. Animal fascioliasis in the State of Paraná, Brazil: data analysis. *Arquivos de Biologia e Tecnologia.* 35, 777-780.

Mancianti, F., Poli, A., Bionda, A., 1989. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parasitol.* 31, 213-230.

Mathias , R., Costa, F.A . L., Goto, H., 2001. Detection of immunoglobulin G in the lung and the liver of hamster with visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 539-543.

Meadows, R., 1978. Renal histopathology. A light, electron and immunofluorescent microscopy study of renal disease. Oxford, 2nd edn., Oxford University Press, England, 544 pp.

Müller, G., Jesus, L.P. de, Paulsen, R.M.M., Souza, C. A., 1997. Prevalência de fasciolose na região Sul do Rio Grande do Sul. *Anais II Congr. Med. Vet. do Cone Sul, XIII Congr. Est. Med. Vet., XXV Congr. Bras. Med. Vet. Gramado*, p.186. (resumo).

Nieto, C.G., Navarrete , I., Habela, M.A ., Serrano, F., Redondo, E., 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural leishmania infection. *Vet. Parasit.* 45, 33-47.

Nimri , L.F., Lanners , N.H., 1994. Immune complexes and nephropathies associated with Plasmodium inui infection in the rhesus monkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51 (2), 183-189. (abstract).

Qiu, H., Leo, J., 1995. Water buffalo and yak production in China. *Anim. Gen. Resour. Infor.* 15, 83-99.

Poli, A., Abramo, F., Mancianti, F., Nigro, M., Pierci, S., Bionda, A., 1991. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopy study. *Nephron*. 57, 444-452.

Robinson, A., Hewert, R.M., Spargo, B.H., 1982. Immune complex glomerulonephritis and amyloidosis in *Schistosoma japonicum* infected rabbits. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 76, 214-226.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., 1997. Hipersensibilidade tipo III, cap. 24. In: *Imunologia*, 4.ed., Malone (ed.), pp. 24.1-24.12.

Sartori, A., Oliveira, A.V. de, Roque-Barreira, M. C., Rossi, M.A., Campos-Neto, A., 1987. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Paras. Immun.* 9, 93-103.

Serra-Freire, N.M. da. 1995. Fasciolose hepática. *A Hora Veterinária*, ed.extra, 1, 13-18.

Sobh, M., Moustafa, F., El-Arbagy, A., Shebab El-Din, M., Shamaa, S., Amer, G. 1980. Nephropathy in asymptomatic patients with active *Schistosoma mansoni* infection. *Intern. Urol. And Nephrol.* 22 (1), 37-43.

Soni, J.L., Cox, H.W.. 1975. Pathogenesis of acute avian malaria. IV. Immunologic factors in nephritis of acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 431-438.

Tafari, W.L., Oliveira, M.R. de, Melo, M.N., Tafari, W.L., 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture in one case reported from Brazil. *Vet. Paras.* 96, 203-212.

Valli, V.E., Fursberg, C.M., 1979. The pathogenesis of *Trypanosoma congolense* infection in calves. V. Quantitative histological changes. *Vet. Pathol.* 16 (3), 334-368.

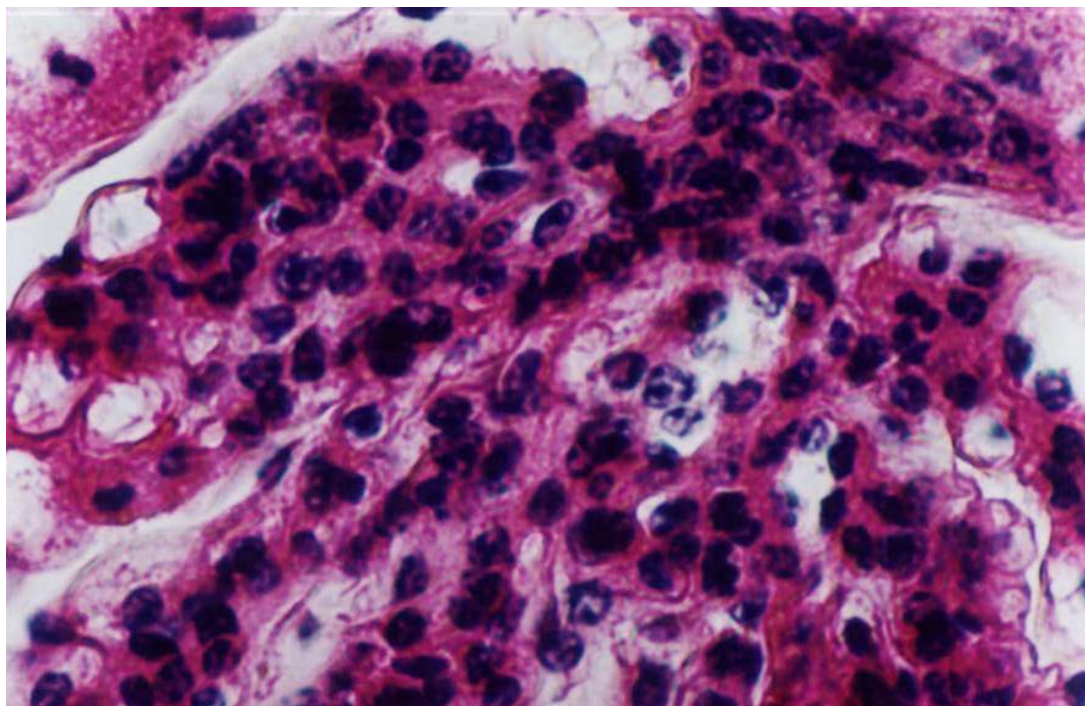


FIGURA 14. Glomerulonefrite mesangioproliferativa. Búfalo. 1000 X. H & E.

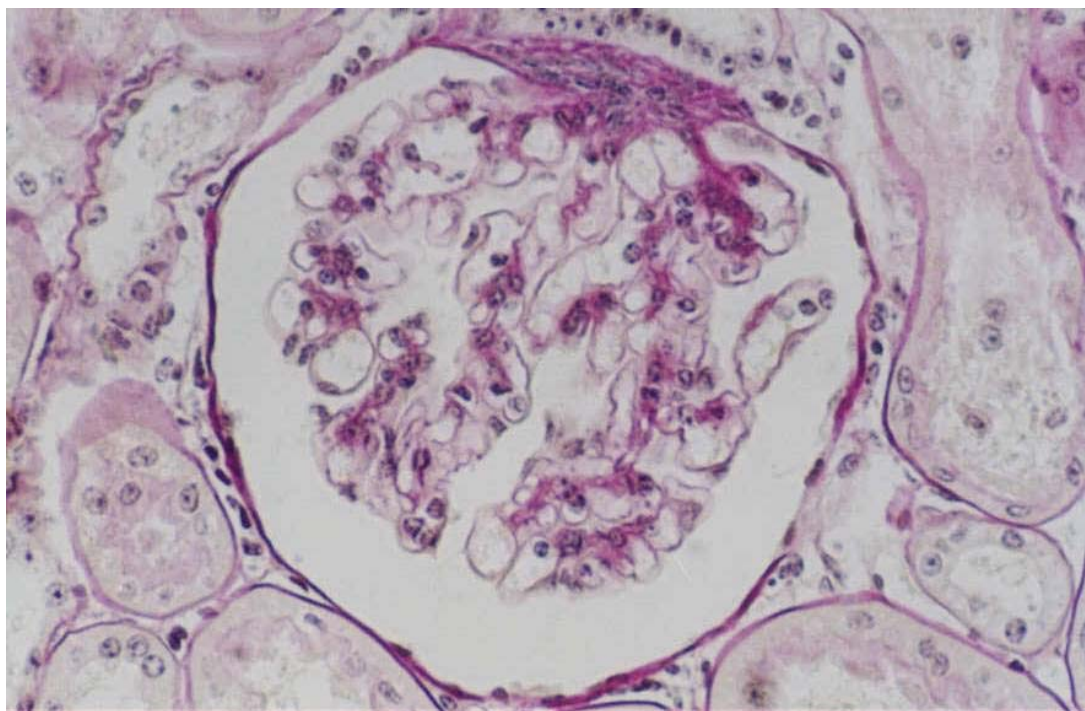


FIGURA 15. Glomerulonefrite membranoproliferativa. Fibrose tubular (setas). Búfalo. 400 X. PAS.

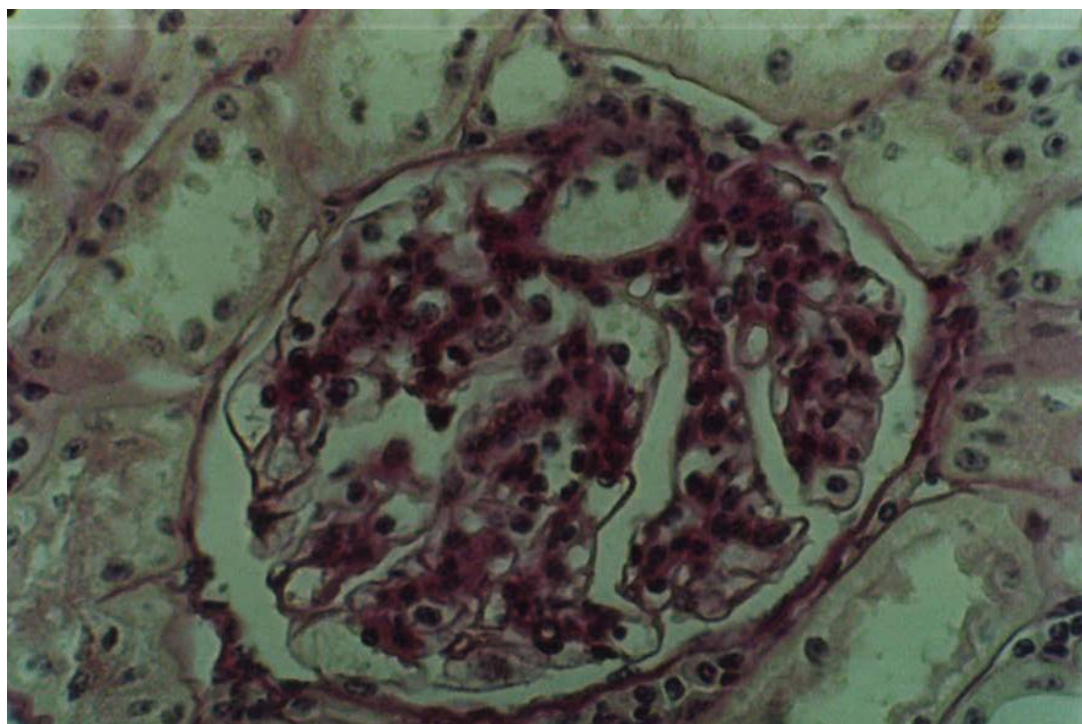


FIGURA 16. Glomerulonefrite mesangioproliferativa. Lobulação do tufo glomerular. Búfalo. 400 X. PAS.

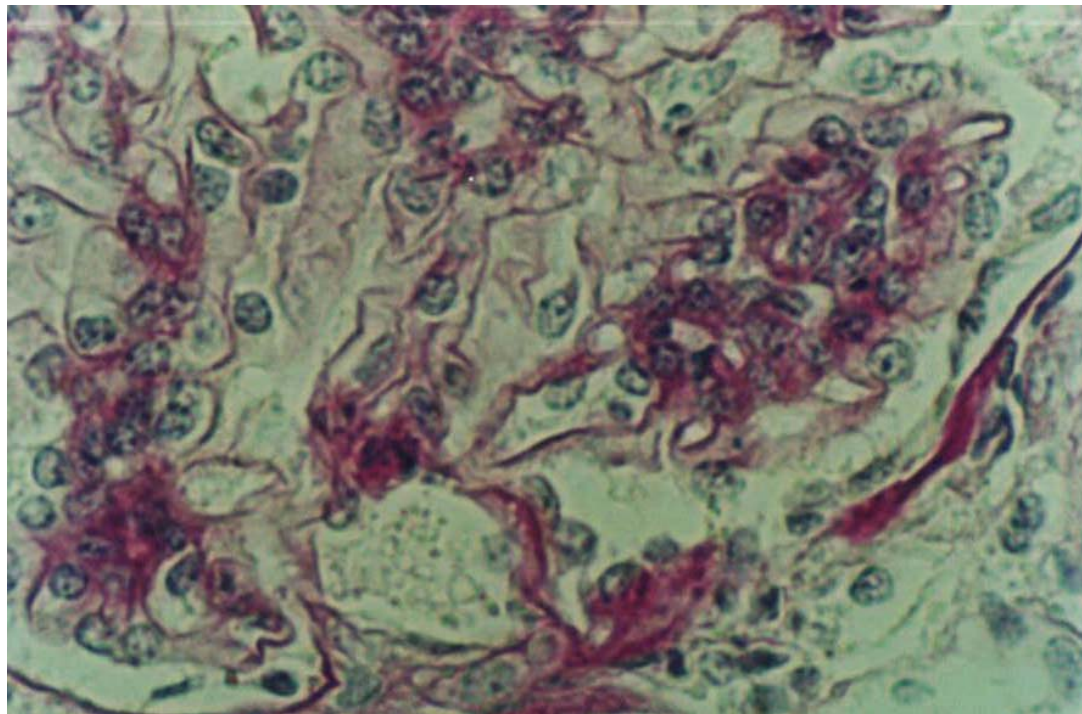


FIGURA 17. Glomerulonefrite membranoproliferativa. Búfalo. 1000X. PAS.

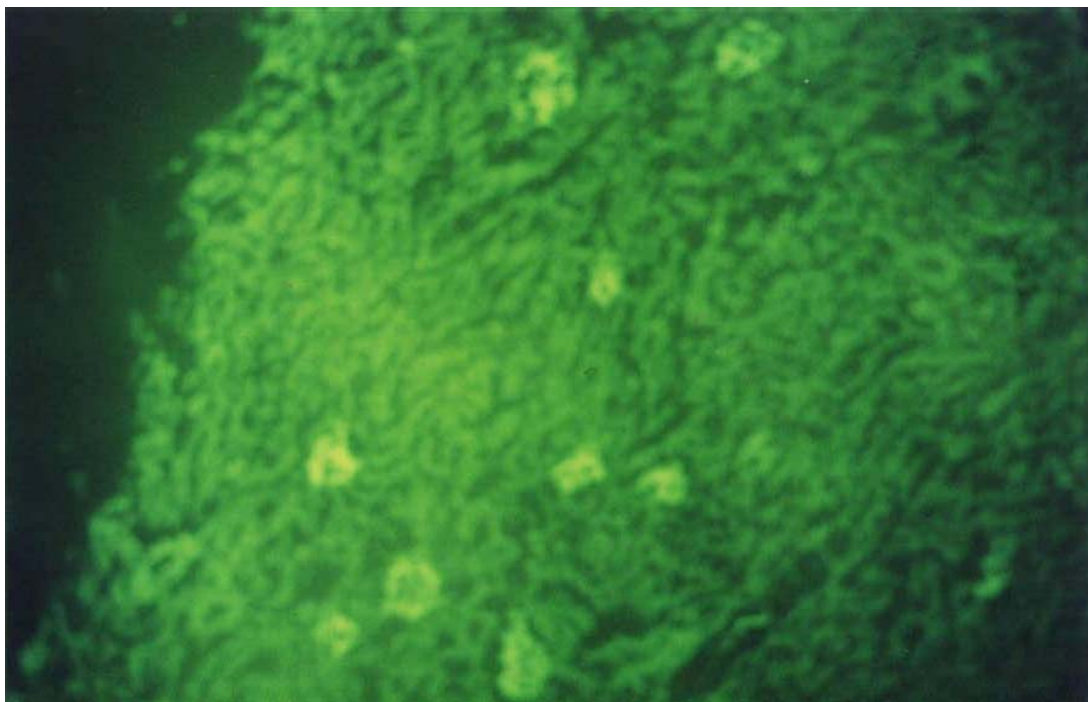


FIGURA 18. Imunofluorescência em biópsia renal de búfalo.
Glomérulos marcados com IgG (setas). 100 X.

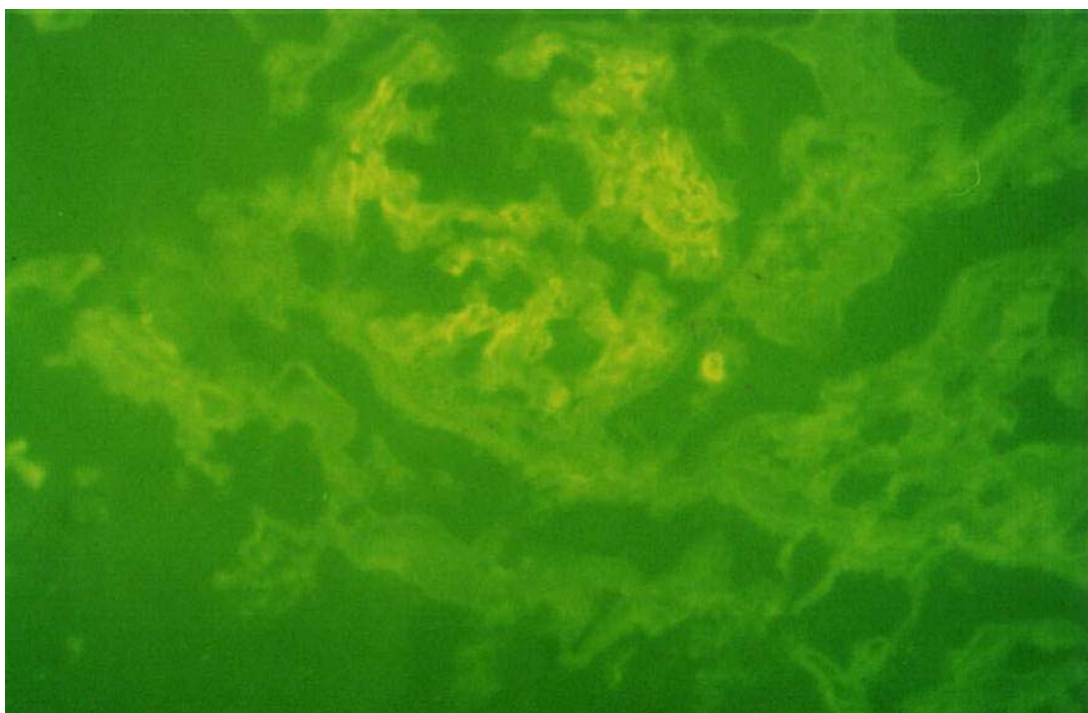


FIGURA 19. Imunofluorescência em biópsia renal de búfalo.
Depósitos granulares e pseudolineares de IgG glomerular. 400 X.

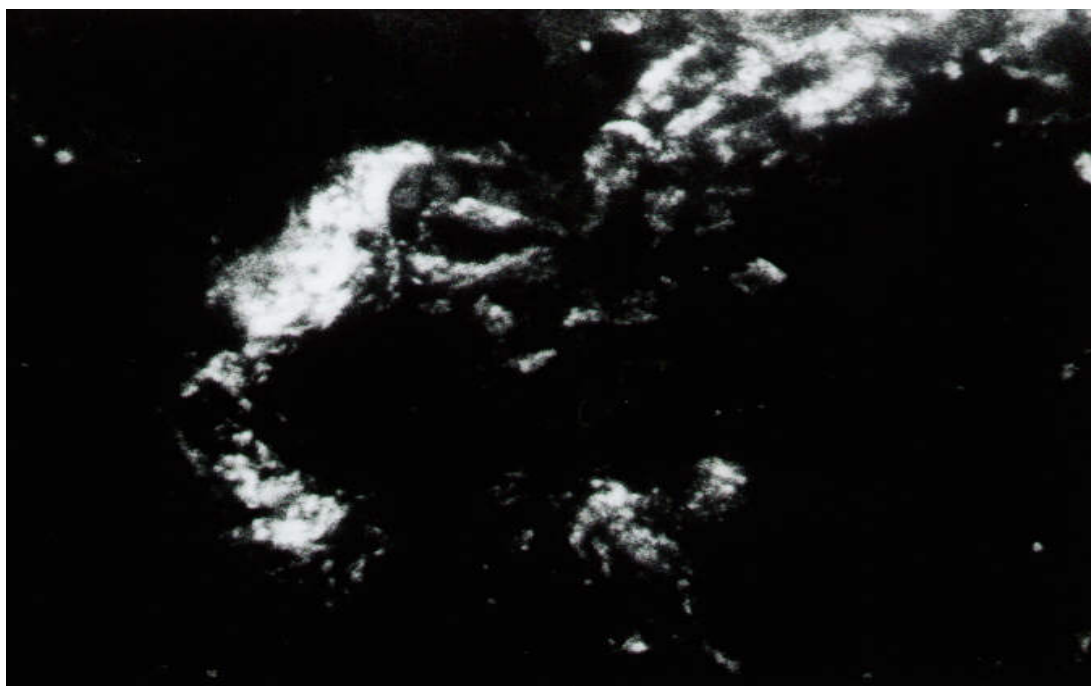


FIGURA 20.Imunofluorescência em biópsia renal de búfalo. Depósitos mesangiais e segmentares de IgG no glomérulo. 400 X.

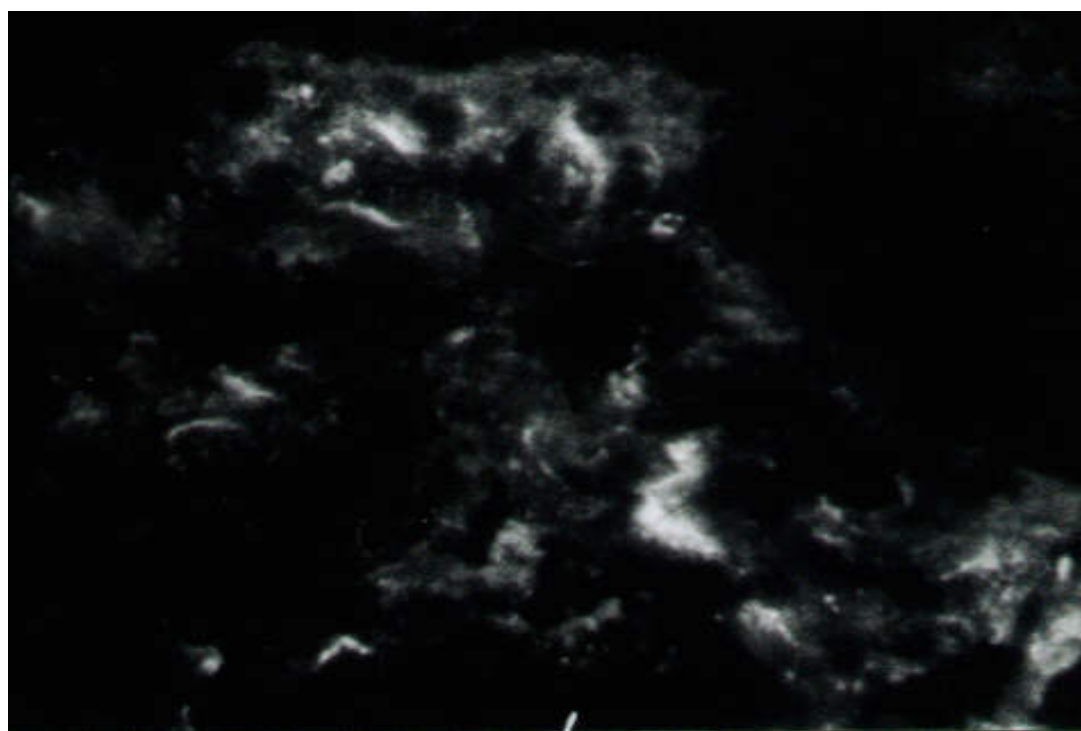


FIGURA 21.Imunofluorescência em biópsia renal de búfalo. Depósitos mesangiais e pseudolineares de IgG no glomérulo. 400 X.

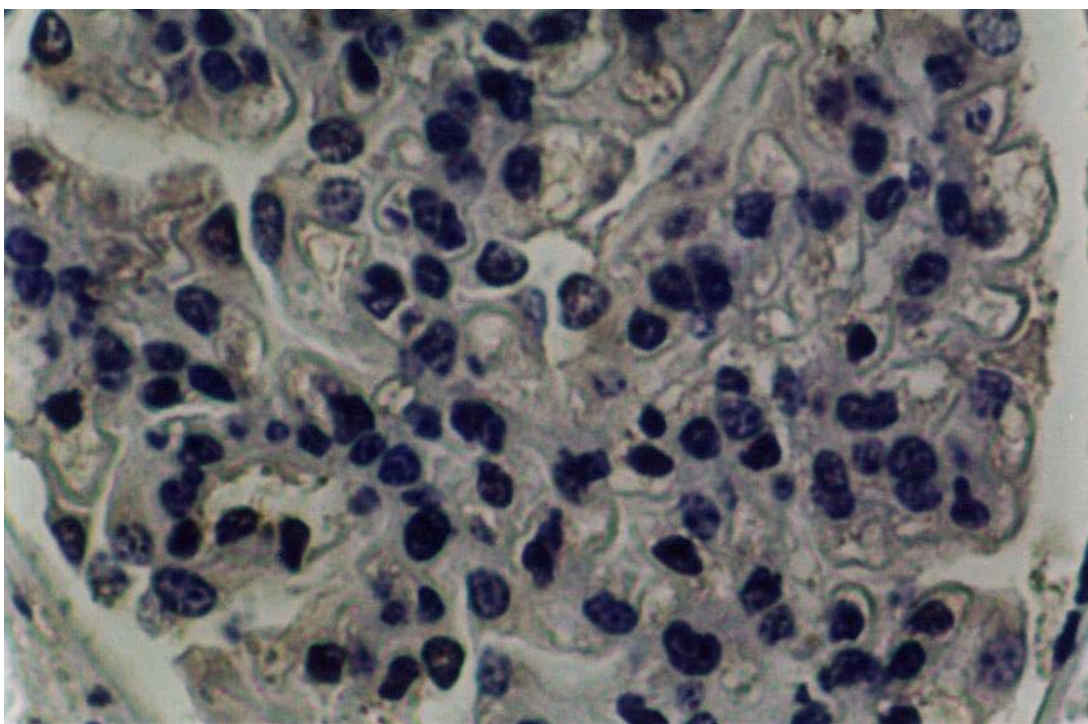


FIGURA 22. Imunoistoquímica em biópsia renal de búfalo. Reação negativa. 1000 X.

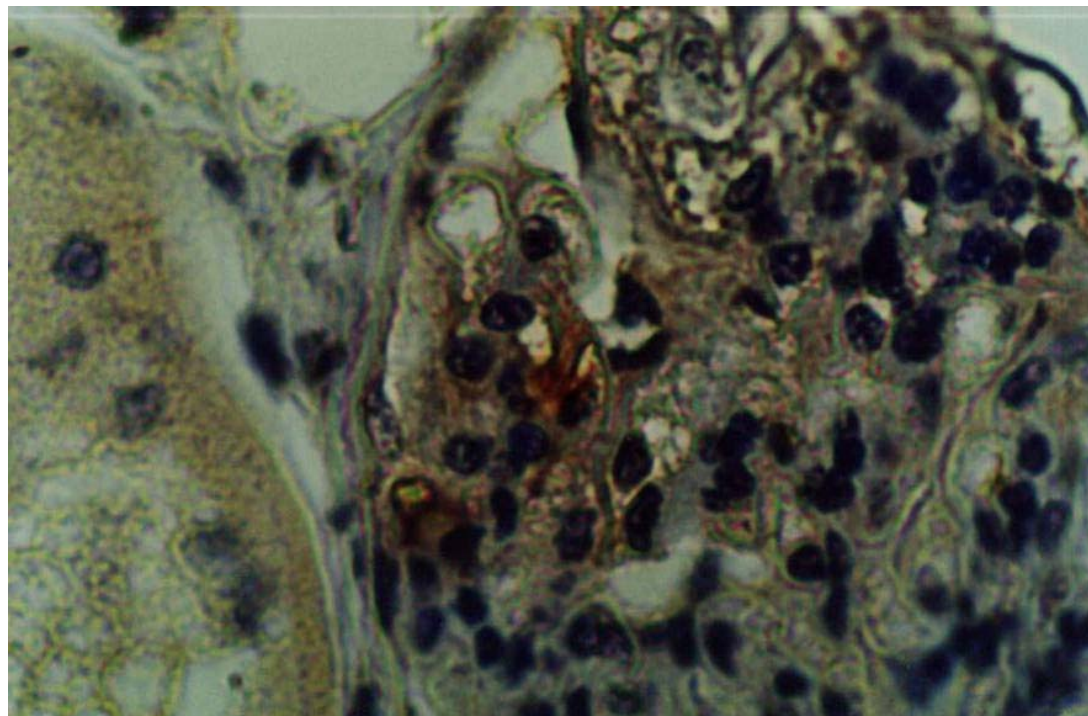


FIGURA 23. Imunoistoquímica em biópsia renal de búfalo. Reação positiva. Antígeno de cor marrom no tufo glomerular (seta). 1000 X.

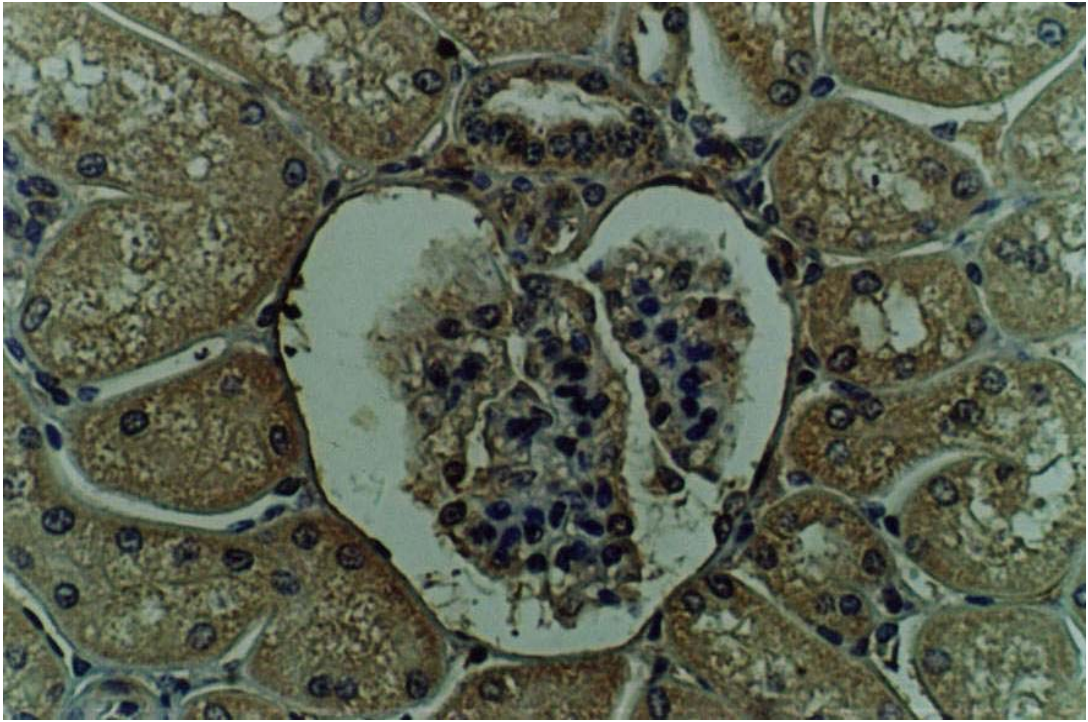


FIGURA 24. Glomérulo de búfalo com forma atípica. 400 X.

8. DISCUSSÃO FINAL

A fasciolose é uma parasitose que acarreta perdas importantes para ruminantes. É de caráter endêmico, no estado do Rio Grande do Sul.

Parasitas causam morbidade e mortalidade, não somente pela invasão e localização em sítios preferenciais, mas também através de efeitos sistêmicos. Várias formas de dano renal têm sido descritas em infecções parasitárias e o mecanismo imune tem papel importante na sua patogênese.

O presente trabalho demonstra a ocorrência de glomerulopatia mediada por complexos imunes decorrentes da fasciolose em bovinos e bubalinos naturalmente infectados.

A metodologia utilizada para o diagnóstico imunohistopatológico proporcionou a obtenção de dados para o estudo de prevalência da fasciolose em bovinos (Artigo 1).

Estimulada pela escassez de dados epidemiológicos sobre a ocorrência de fasciolose em búfalos, estes animais foram incluídos na pesquisa (Artigo 2).

A hipótese da glomerulonefrite decorrente da fasciolose foi primeiro determinada por técnicas histopatológicas. Glomerulonefrite de padrão proliferativo, membranoso e mesangial, são freqüentes em endoparasitoses, entretanto são variáveis as manifestações que podem governar o padrão morfológico das glomerulonefrites nos quais os complexos imunes parasitários estão envolvidos. De um lado está a natureza do antígeno, a quantidade presente e a duração da exposição aos antígenos. Por outro lado, está o tipo, a quantidade e a duração da resposta de anticorpo, que pode ser dependente, não somente de um antígeno em particular, de fatores estressantes e da individualidade genética.

Os resultados descritos nos Artigos 3 e 4 mostraram padrão de dano renal semelhante ao evidenciado em outras parasitoses. Para a comprovação da hipótese de glomerulopatia decorrente da deposição de complexos imunes, foram utilizadas técnicas imunológicas, imunofluorescência direta, imunofluorescência indireta e imunoistoquímica.

Os diagnósticos pelas técnicas de imunofluorescência e imunoistoquímica foram determinantes para a demonstração do envolvimento de complexos imunes depositados nos rins de bovinos e bubalinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*.

9. CONCLUSÕES

1. A prevalência de *Fasciola hepatica* em bovinos foi de 10,34 %, demonstrando que este índice tem se mantido estável nos últimos anos no estado do Rio Grande do Sul.
2. A prevalência de *Fasciola hepatica* em búfalos foi de 20%. Este dado epidemiológico mostra taxa dentro dos valores médios para o Estado.
3. A demonstração de glomerulonefrite membranoproliferativa e mesangioproliferativa detectadas por técnicas histopatológicas avaliadas neste trabalho, está em consonância com o registrado em outras parasitoses.
4. O diagnóstico por imunofluorescência direta, imunofluorescência indireta e imunoistoquímica são ferramentas importantes para a confirmação do dano renal associado à fasciolose, em decorrência da presença de complexos imunes circulante depositados no glomérulo de bovinos e bubalinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*.

REFERÊNCIAS

1. ABÍLIO, F.G.P.; WATANABE, T. Ocorrência de *Lymnea columella* (Gastropoda : lymnaeide), hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, para o Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 32, n.2, p. 185-186, 1998.
2. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Fascioliasis. In: OPS (ed.) **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed., 1986, cap. 121.3., p. 689-696.
3. ACOSTA, D. Epidemiologia y control de *Fasciola hepatica* en el Uruguay. In: A. NARI, C. FIEL (eds.) **Enfermedades Parasitarias de Importancia Econômica em Bovinos-Bases epidemiológicas para su prevención y control**. Montevideo: Editorial Hemisférico Sur, cap. 11, p. 232-256, 1994.
4. AIKAWA, M.; ABRAMOWSKY, C.; POWERS, K. G.; FURROW, R. Dirofilariasis. IV. Glomerulonephropathy induced by *Dirofilaria immitis* infection. **American of Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 1, p. 84-91, 1981.
5. ALCAINO, H. Epizootiologia de la distomatosis bovina en Chile. **Parasitologia al Dia**, v. 9, p. 22-26, 1985.
6. AMATO, S.B.; REZENDE, H.E.B. de GOMES, D.C.; SERRA FREIRE, N.M. Epidemiology of *Fasciola hepatica* infection in the Paraíba River Valley, São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.22, p. 275-284, 1986.
7. ANDERSON, N.; LUONG, T. T.; VO, N. G.; BUI, K. L.; SMOOKER, P. M.; SPITHILL, T. W. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 15-24, 1999.
8. ANDRADE, Z.A .; MARCK, E. V. Schistosomal glomerular disease (a review). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 499-506, 1984.
9. ANDRES, G.A .; McCLUSKEY, R.T. Tubular and intestinal renal disease due to immunologic mechanisms. **Kidney International**, v. 7, p. 271-289, 1975.
10. ANDREWS, S.J. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: J.P. DALTON (ed.) **Fasciolosis**. New York: CABI Publishings, cap. 1, p. 1-29, 1999.
11. ANÔNIMO. **Manual do Produtor-Fasciolose**. Comissão Estadual de Controle da Fasciolose Bovina. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Secretaria

da Agricultura e Abastecimento, Emater/RS, Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente, RS, 1996. 23 p.

12. ARAÚJO, J.L.B.; LINHARES, G.F.C.; PAÇÔ, J.M. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Pulmonata, Lymnaeidae), no Estado de Goiás. Considerações sobre os parasitos por ela transmitidos. **Revista Patologia Tropical**, v.24, n.2, p. 291-300, 1995.
13. ARAÚJO, J.L.B.; GARCIA, C.A.; LINHARES, G.F.C. Ocorrência de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda, Fasciolidae), no Estado de Goiás. **Revista Patologia Tropical**, v. 24, n.2, p. 283-289, 1995.
14. ARENAS, R. E. V.; TURNER, D. R. Pathology of interstitial nephritis induced in guinea pigs by exoantigens. **Nephron**, v. 32, p. 170-179, 1982.
15. BAGCHUS, W. M.; HOEDEMACKER, P. J.; ROZING, J.; BAKKER, W. W. Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy1 .Antibodies a sequential histological and ultrastructural study in the rat. **Laboratory Investigation**, v. 55, n. 6, p. 680-687, 1986.
16. BALDOCK, F.C.; ARTUR, R.J.A. Survey of fascioliasis in beef cattle killed at abattoirs in Southern Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n.10, p. 324-326, 1985.
17. BARNETT, E.U. Circulating immune complexes: their biologic and clinical significance. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.78, n.6, p.1089-1096, 1986.
18. BARNOUIN, J.; MIALOT, M.; LEVIEUX, D. Evaluation of hepatic pathology of bovines by a blood sample. Relation with histopathology findings. **Ann. Rech. Vet.**, v. 12, n.4, p.363-369, 1982.
19. BARSOUM, R.; NABIL, M.; SAADY, G.; GENIN, C.; SALEH, E.; FRANCIS, M.; EL-KALIOUBI, A.; ISKANDER, I.; EL-GAREM, A. Immunoglobulin-A and the pathogenesis of schistosomal glomerulopathy. **Kidney International**, v. 50, p. 920-928, 1996.
20. BECK, A.A.H. Fasciolose bovina. **Boletim Técnico 33**, EMPASC, Santa Catarina, 1985. 18 p.
21. BECK, A.A.H. Fasciolose. **A Hora Veterinária**, n. 75, p. 65-70, 1993.
22. BORAY, J.C. Experimental fascioliasis in Austrália. **Advances in Parasitology**, v. 7, p. 95-209, 1969.

23. BORDIN, E.L. Revisão da anatomia patológica da fasciolose bovina. **A Hora Veterinária**, Ed. extra, n.1, p.33-35, 1995.
24. BOSSAERT, K.; JACQUINET, E.; SAVENDERS, J.; FARNIR, F.; LOSSON, B. Cell-mediated immune response in calves to single dose, trickle, and challenger infections with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, v. 88, n. 1-2, p. 17-34, 2000.
25. BOUVRY, M.; RAU, M.E. Seasonal variations in eggs passage of *Fasciola hepatica* in dairy cows in Quebec. **Veterinary Parasitology**, v.22, p.267-273, 1986.
26. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
27. BRISKEY, D. W.; SCROGGS, M. G.; HURTIG, F. S. A prevalence survey of liver flukes (*Distoma*) in beef cows at slaughter in the western United States. **Agriculture Practice**, v. 15, p. 8-11, 1994.
28. BRISKEY, D.W. Diagnosis of liver fluke infection in cattle. A diagnostic review. **Merial Veterinary Bulletin**. Disponível em: <URL: <http://D:ivomec.plus/98018.htm> > Acesso em :23. fev. 2001.
29. BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, A. ; AMATO NETO, V.; DUARTE, I.S.; PENNA, D. O . Glomerular involvement in human Kala-azar: a light, immunofluorescent and electron microscopic study based on kidney biopsies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, p. 9-18, 1975.
30. BRUNO, S. F.; MATTOS JÚNIOR, D. G. de; SILVA, E. V.; FRANCIS, M.; BRITO, D. B. *Fasciola hepatica* (Linnaeus 1758) em bovinos no município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitologia al día**, v. 19, n. 1-2, p. 65-68, 1995.
31. BUNDY, D.A.P.; ARAMBULO, P.V.; GREY, C.L. La fascioliasis en Jamaica: aspectos epidemiológicos y económicos de una zoonosis parasitaria transmitida por caracoles.. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 96, n. 1, p. 1-19, 1984.
32. CARVALHO, E. M.; ANDREWS, B. S.; MARTINELLI, R.; DUTRA, M.; ROCHA, H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in visceral leishmaniasis and schistosomiasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p.61, 1983.

33. CARVALHO, G.A. de; UETA, M.T. e ANDRADE, C.F.S. de, Búsqueda de xifidiocercarias (Trematoda) en moluscos de agua dulce recolectados en nueve municipios del Estado de São Paulo, Brasil. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.56, n.1-2, 2001. Disponível em:<[URL:http://www.scielo.cl](http://www.scielo.cl)> Acesso em: 05. jan. 2002.
34. CASAROSA, L.; PAPINI, R.; MANCIANTI, F.; ABRAMO, F.; POLI, A. Renal involvement in mice experimentally infected with *Toxocara canis* embrionated eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 42, p. 265-272, 1992.
35. CATTELL, V.; JENNETTE, J.C. Mechanisms of acute inflammatory and immunologic renal injury. In: JENNETTE, J. C.; OLSON, J. L.; SCWARTZ, M. M.; SILVA, F. G. **Heptinstall's Pathology of the Kidney**, 5. ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers, cap. 3, p. 85-136, 1998.
36. CELEB, A.; ULTAV, R. Losses from livers condemnations from fascioliasis over a year at Carsamba district Abatton. **Veter. Hckimlu Deringi Dergisi**, v.58, p.79-81, 1988.
37. CERVI, L. A .; RUBINSTEIN, H.; MASIH, D. T. Sorological eletrophoretic and biological properties of *Fasciola hepatica* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 34, p. 517-525, 1992.
38. CHEMELLO, D.; ECKERT, G. U.; TEIXEIRA, C. G. Imunidade a parasitas. In: SCROFERNEKER, M. L.; POHLMANN, P. R. **Imunologia básica e aplicada**. 1.ed. Porto Alegre, Brasil: Sagra Luzzatto, cap. 22, p. 362-380, 1998.
39. CHEN, L.; DAUGSCHIES, A .; WANG, B.; MAO, X. Blood eicosanoids and immune indices during fasciolosis in water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, v. 49, p. 273-278, 2000.
40. CHUGH, K.S.; SAKHUJA, V. Glomerular disease in the Tropics. **American Journal of Nephology**, v.10, p.437-450, 1990.
41. CHURG, J.; BERNSTEIN, J.; GLASSOCK, R.J. **Renal disease: Classification and Atlas of Glomerular Diseases**, 2. ed. New York: Igaku-Shoin, 1995. 541 p.
42. CLAXTON, J.R.; ZAMBRANO, H., ORTIZ, P.; AMORÓS, C.; DELGADO, E.; ESCURRA, E.; CLARKSON, M.J. The epidemiology of Fasciolosis in the inter-aldean valley of Cajamarca, Peru. **Parasitology International**, v.46, n. 4, p.281-288, 1997.

43. CONFER, A.W., PANCIERA, R.J. Sistema Urinário. In: CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**, 2 ed. Porto Alegre, Brasil: **Artmed**, cap. 5, p. 228-250, 1998.
44. CORDOVA, M.; NOPO, H.; BELLATIN, J.; NAQUIRA, C.; GUERRA, H.; ESPINOSA, J.R. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fascioliasis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p.660-666.1997. Disponível em: < URL: <http://www.coneytec.gob.pe/proyectos/fasciola.htm>>. Acesso em: 30. out. 2000.
45. COSTA, F. A. L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M.M.S.; KLEIN, R. P.; MENDONÇA, I. H.; GOTO, H. CD4 (+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1455-1458, 2000.
46. COSTA, R. S.; MONTEIRO, R. C.; HEHUEN, A. ; JOSKOWICZ, M. ; NOEL, L. H.; DROZ, D. Immune complex- mediated glomerulopathy in experimental Chagas' disease. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 58, n. 1, p. 102-114, 1991.
47. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. The kidney. In: **Robbins Pathologic Basis of Disease**.6. ed. New York: W.B.Sounders Company, cap.21, p. 931-965, 1999.
48. DALTON, J.P., **Fasciolosis**. 1. ed. Cambridge,UK: University Press, 1999. p. 113-149.
49. DOW, C.; ROSS, J. G.; TODD, J. R. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. **Parasitology**, v. 58, p. 129-135, 1968.
50. DOYLE, J.J. Acquired immunity to experimental infection with *Fasciola hepatica* in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.12, p.527-534, 1971.
51. DUFFUS, W.P.H.; FRANKS, D. In vitro effect of immuno serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. **Clinical and Experimental Immunology**, v.41, p. 430-440, 1980.
52. DWINGER, R.H.; LERICHE, P.D.; KUHNE, G.I. Fascioliasis in beef cattle in north-west Argentina. **Tropical Animal Health Prod.**, v.14, n.3, p. 167-171, 1982.
53. ECHEVARRIA, F. A . M. Fasciolose. Ocorrência, diagnóstico e controle. **Agroquímica Ciba Geigy**, n. 27, p. 4-9, 1985. (a)

54. ECHEVARRIA, F. Mesa Redonda sobre fasciolose bovina. **A Hora Veterinária**, Ed. extra, n.1, p.27-31, 1995. (b)
55. EDDI, C. Distomatosis: epidemiological and economic aspects of this zoonosis. In: SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY OF FOOD-BORNE PARASITIC ZOOSES, 1990. Montevideo, Uruguai. **Proceedings**. 1990, p. 50-59.
56. EDELWEISS, M. I. A .; LIZARDO-DAUDT, H. M. Naturally existing model of glomerulonephritis mediated by immune complexes associated with hydatidosis in sheep. **Nephron**, v. 57, p. 253-254, 1991.
57. EHRICH, J. H.; STERZEL, R. B.; DEICHER, H. R.; FOELLMER, H. G. Rat malarial glomerulonephritis . An experimental model of post infections glomerular injury. **Virchows Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, v.37, n. 3, p. 343-356, 1981.
58. ESPINO, A . M.; BORGES, A .; DUMÉNIGO, B. E. Coproantigenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad em el diagnostico de la fascioliasis. **Revista Panamer. de Salud Publica**, v. 7, n. 4, p. 225-231, 2000.
59. EUCINAS-GARCÍAS, R.; QUIROZ-ROMERO, H.; GUERRERO-MOLINA, C.; OCHOA-GALVAN, P. Frecuencia de fascioliasis hepatica e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrecia, México, D.F. **Veterinaria Mexico**, v.20, p.423-426, 1989.
60. FABRE, J.; BOUTINET, C.; LIFERMANN, F. Pneumothorax in distomatosis. **Presse Medicale**, v.30, n.32, p.1587-1588, 2001.
61. FAIRWEATHER, I.; THREADGOLD, L.T.; HANNA, R.E.B. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: **Fasciolosis**. 1. ed. Cambridge, UK: University Press, 1999. cap. 3, p. 47-111.
62. FERRE, I.; ORTEGA-MORA, L. M.; HOJO-VÁZQUEZ, F. A . Serum and bile antibody response (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 261-267, 1997.
63. FRANÇA, I. *Fasciola hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba. **Boletim do Campo**, n.230, p. 21-22, 1969.
64. FROYD, G.. Liver fluke in Great Britain: a survey of affected livers. **Veterinary Record**, v. 97, n. 25-26, p. 492-495, 1975.

65. FYFFE, J. A Review of liver fluke disease. Disponível em:< URL: <http://www.bloodlines.undaware.com.au/vetdoc5.html>>. Acesso em : 02.set.1999.
66. GENICOT, B.; MOULIGNEAU, F.; LEKEUX, P. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, Serie B, n.38, p.203-208, 1991.
67. GOLDSTEIN, H. F. Alterações renais em ovelhas com hidatidose: modelo naturalmente existente de glomerulopatia por imunocomplexos. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, FAMED/UFRGS. 1992. 53 p.
68. GÓMEZ, T.H. Frecuencia de *Fasciola spp.* en pulmones de bovinos y descripción de las lesiones producidas. **Veterinaria Mexico**, v.15, n.2, p.169, 1984.
69. GONZALEZ ,J.C.; SANCHEZ, V.M.; THOMÉ, J.M.; GONÇALVES, P.C.; OLIVEIRA, C.M.B. *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Lin.1758) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 21, n. 1, p. 37-40, 1974.
70. GONZALEZ, J.C.; SANCHEZ, V.M.; THOMÉ, J.W.; GONÇALVES, P.C.; OLIVEIRA, C.M.B. *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Lin.1758) no Rio Grande do Sul (Brasil) In: Congresso da Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 12, Bagé, 1971. **Resumos**. Bagé: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1971. p.35.
71. GONZALEZ-LANZA, C.; MANGA-GONZALEZ, Y.; DEL-POZO-CARNERO, P.; HIDALGO-ARGUELLO, R. Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. **Veterinary Parasitology**, v.34, n.1-2, p.35-43, 1989.
72. GOULD, S.M.; McINNES, E.L. Immune-mediated thrombocytopenia associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.40, n.5, p:227-232, 1999.
73. GRAUER, G. F.; CULHAM, C. A .; DUBIELZIG, R. R.; LONGHOFER, S. L.; GRIEVE, R. B. Experimental *Dirofilaria immitis* –associated glomerulonephritis induced in part by in situ formation of immune complexes in the glomerular capillary wall. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 585-593, 1989.
74. GRAUER, G.F.; CULHAM, C. A .; COOLEY, A . J.; POFF, B. C.; OBERLEY, T. D.; BROWNFIELD, M. S.; GRIEVE, R. B. Clinicopathologic and histologic evaluation of *Dirofilaria immitis*-induced nephropathy in dogs. **American J. of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, p. 588-596,, 1987.

75. GUTIERRES,V.C.; UENO,H.; MÜLLER,G.; ALMEIDA,J.A.de; GONÇALVES,P.C.; MATTOS, M.J.T.de; SILVA,C.A.A.da. Biodinâmica de *Lymnaea viatrix* relacionada com a ocorrência de fasciolose aguda no rebanho ovino em duas regiões do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 18, 1982,Camboriú. **Resumos**. Camboriú: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1982, p.120.
76. HAINES, H.; FARMER, J. N. Glomerular filtration rate and plasma solutes in BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei*. **Parasitology Research**, v. 77, n. 5, p.411-414, 1991.
77. HATSCHBACH,P.J.A. A *Fasciola hepatica* e sua história. **A Hora Veterinária**, Ed. extra, vol.15, n.1, p. 10-11, 1995.
78. HAWN,T.R.; JONG,E.C. Update on hepatobiliary and pulmonary flukes.**Curr. Infect. Dis. Rep.**, v.1, n.5, p..427-433, 1999.
79. HOLLAND,W.G.; LUONG,T.T.; NGUYEN,L.A.; DO,T.T.; VERERUYSSSE,J. The epidemiology of nematode and fluke infections in cattle in the Red River Delta in Vietnam. **Veterinary Parasitology**, v. 93, n.2, p. 141-147, 2000.
80. HOUBA, V. Experimental renal disease due to schistosomiasis. **Kidney International**, v. 6, p. 30-43, 1979.
81. HURTADO, A . A. C.; SÁNCHEZ, I. E.; ROMERO, Frecuencia de fasciolosis hepática en bovinos sacrificados en las plantas tipo Inspección Federal en México de los anos 1979-1987. **Veterinaria México**, v. 23, n. 4, p. 339-342, 1992.
82. ISAACS, K. L.; MILLER, F. Role of antigens size and charge in immune complex glomerulonephritis. **Lab. Invest.**, v. 47, n. 2, p. 198-205, 1982.
83. JIANG,S.X.; BAYÓN,J.E.; FERRE,I.; MAO,X.Z.; GONZÁLEZ-GALLEGO,J. Effect of experimental fasciolosis on antipyrine metabolism and clearance in water buffalos. **Veterinary Parasitology**, v. 88, n.3-4, p.177-186, 2000.
84. JONES,T.C.; HUNT,R.D.; KING,N.W. Immunopathology. In: **Veterinary Pathology**, 6.ed. Baltimore, USA: Willians e Wilkins, 1996, cap. 7, p. 177-196.
85. JUBB,K.U.F.; KENNEDY,P.C.; PALMER,N. **Pathology of Domestic Animals**, 4.ed. San Diego: Academic Press, 1993, v. 2. 747 p.
86. KAPLAN,R.M. Liver flukes in cattle: control based on seasonal transmission dynamics.**Comp. Cont. Educ. for the Pract. Vet.**, v.16, p.687-693, 1994.

87. KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; HIGHTNER, H.; WEBSTER, H. K.; JOHNSON, A. J. Visceral leishmaniasis in the Germany shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v.21, n. 1, p. 74-79, 1984.
88. KNAPP,S.E.; DUNKEL,A.M.; HAN,K.; ZIMMERMAN,L.A. Epizootiology of fascioliasis in Montana. **Veterinary Parasitology**, v. 42, p. 241-246, 1992.
89. LEMES,M.H.L.; HERNÁNDEZ,S.; ACUÉNA,A.M.; NARI,A. Fascioliasis in la República Oriental del Uruguay **Revista Medicina del Uruguay**. Disponível em : <URL: <http://www.smu.org.uy/literatura/rmu/1996v1/lopez.htm>> Acesso em: 15. abril. 1999.
90. LUTZ,A. Sobre a ocorrência de *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. **Boletim do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p. 9-12, 1921.
91. LUZ, J. E.; FOCACCIA, S. R.; OLIVEIRA, A . G. de; PISANI, J. C. Human fascioliasis in the metropolitan área of Curitiba, Brazil. Evaluation of the foci of infection and report of nine cases treated with triclabendazole. **The Brazilian J. of Infectious Disease**, v. 3, n. 6, p. 220-225, 1999. (b)
92. LUZ,J.E.; GAZDA, C. M.; YADA, R. S. Animal fascioliasis in the State of Paraná, Brazil: data analysis.**Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, p. 777-780, 1992.
93. MALONE Jr,J.B. Fascioliasis and cestodiasis in cattle. **Veterinary Clinical Of North America: Food Animal Practice**, v.2, n.2, p. 261-275, 1986.
94. MANCIANTI, F.; POLI, A .; BIONDA, A . Analysis of renal immune deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. **Parasitologia**, v. 31, n. 2-3, p. 213-230, 1989.
95. MARCUSSEN, N.; VETNER, M.; KRISTENSEN, H. M. Interstitial nephritis and glomerulonephritis in visceral leishmaniasis in a dog. A case report. **APMIS**, v. 97, n. 12, p. 1137-1140, 1989.
96. MAS-COMA,S.;BARQUES,M.D.;ESTEBAN,J.G. Human fascioliasis. In: DALTON, J. P. **Fasciolosis**.1. ed. New York: Cabi Publishing, 1999, cap. 12, p. 411-434.
97. MATHIAS, R.; COSTA, F.A . L.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. **Brasilian of J. Medicine and Biology Research**, v.34, n. 4, p.539-543, 2001.

98. MAURI,M.; ALONSO,G. Comportamiento de la zona Centro-Oeste de la provincia de la Habana en el quinquenio 1980-1984. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias** , v.20, n.2, p. 143-154, 1989.
99. McCOLE,D.F.; DOHERTY, M.L.; TORGERSON,P.R.; BAIRD,AW. Local immune responses in colon from cattle infected with *Fasciola hepatica*. **International J. for Parasitology**, v.28, p.1733-1737, 1998.
100. MEADOWS, R. **Renal histopathology. A light, electron and immunofluorescent microscopic study of renal disease**. 2. ed. Oxford Medical Publications: Oxford University Press, Oxford, 1978. 544 p.
101. MEEUSEN,E.N.T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v.84, n.3-4, p.259-273, 1999.
102. MEZZARI,A.; ANTUNES,H.B.B.; COELHO,N.; CAUDURO,P.F.; BRODT,T.C. Fasciolíase humana no Brasil diagnosticada por colangiografia endoscópica retrógrada. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v.36, n.2, p.93-95, 2000.
103. MORALES,M.A.; LUENGO,J.; VASQUEZ,J. Distribución y tendencia de la fasciolosis en ganado en Chile,1989-1995. **Parasitologia al Día**, v.24, n.3-4, 2000. Disponível em:<URL:<http://www.scielo.br>. Acesso em: 01.jan.2002.
104. MOUKRIM, A .; RONDELAUD,D. Premières étudu epidemiologiques sur un foyer de distomatose animale a *Fasciola hepatica* L. Dans la vallée de L'Oued Massa (Marac). **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 142, p. 839-843, 1991.
105. MULCAHY,G.; JOYCE,P.; DALTON,J.P. Immunology of *Fasciola hepatica* infection. In: **Fasciolosis**. 1. ed. New York: Cabi Publishing, 1999, cap. 10,p. 341-375.
106. MÜLLER,G. Ocorrência de *Lymnaea viatrix* Orb.1935 como hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Lin., 1758 no município de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, FAVET/UFRGS. 1982. 42 p.
107. MÜLLER,G.; UENO,H. *Lymnaea vitrix* Orb, 1835, naturalmente infectadas com *Fasciola hepatica* Lin. 1758, no município de Santa Vitória do Palmar-RS. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 7, 1982, Porto Alegre. **Resumos** . Porto Alegre : Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1982. p.42.
108. MÜLLER,G.; JESUS,L.P. de; PAULSEN,R.M.M.; SOUZA,C.A. Prevalência de fasciolose na região sul do Rio Grande do Sul.In: II Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, XII Congresso Estadual de Medicina Veterinária e

XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1997, Gramado. **Resumos** . Gramado: COMBRAVET, 1997. p.186.

109. NAKAGAKI, K.; NOGAMI, S.; HAIASHI, Y.; HAMMERBERG, B.; TANAKA, H.; OHISHI, I. *Dirofilaria immitis* : detection of parasite-specific antigen by monoclonal antibodies in glomerulonephritis in infected dogs. **Parasitology Research**, v. 79, n. 1, p. 49-54, 1993.
110. NARI, A .; CARDOZO, H. Prevalência y distribución geográfica de la fascioliasis hepatobiliar en bovinos de carne del Uruguay. **Veterinaria**, v. 13, n. 63, p. 11-16, 1976.
111. NATALI, P. G.; CIOLI, D. Immune complex nephritis in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **European Journal for Immunology**, v.6, n. 5, p. 359-364, 1976.
112. NETO, J.L.A.; FILHO, M.C.; LUIZ, E.; SICILIANO, R.C.; FILHO, A.G.de O .; PISANI, J.C. Human fascioliasis in the metropolitan área of Curitiba, Brasil. Evaluation of the foci of infection and report of nine cases treated with Triclabendazole. **Brazilian Journal of Infections Diseases**, v.3, n.6, p. 220-225, 1999.
113. NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A .; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural leishmania infection. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 33-47, 1992.
114. NIMRI, L. F.; LANNERS, N. H. Immune complexes and nephropathies associated with *Plasmodium inui* infection in the rhesus monkey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 2, p. 183-189, 1994.
115. OLAECHEA, F.V. Epidemiologia y control de *Fasciola hepatica* en la Argentina. In: NARI, A .; FIEL, C. (eds.) **Enfermedades Parasitarias de Importancia Economica en Bovinos- Bases epidemiológicas para su prevención y control**. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur, cap. 10, p. 213-232, 1994.
116. OLIVEIRA, A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SARTORI, A .; CAMPOS-NETO, A .; ROSSI, M. A . Mesangial proliferative glomerulonephritis associated with progressive amyloid deposition in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. **American Journal of Pathology**, v. 120, n.2, p. 256-262, 1985.
117. OLSON, J.L. Progression of Renal Disease. In: JENNETTE, J. C.; OLSON, J. L.; SCHWARTZ, M. M.; SILVA, F. G.. **Heptinstall's Pathology of the**

- Kidney.** 5 ed. Philadelphia: Hippincott-Raven Publishers, 1998, cap. 4, p. 137-167.
118. ORTIZ, P.L.; CLAXTON, J.R.; CLARKSON, M.J.; McGARRY, J.; WILLIAMS, D.J. The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 121-134, 2000.
119. PARAENSE, W.L. *Lymnaea columella* in Northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p. 477-482, 1983.
120. PARAENSE, W.L. *Lymnaea columella*: Two new Brazilian localities in the states of Amazonas and Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 121-123, 1986.
121. PARAENSE, W.L. *Lymnaea rupestris* sp. from Southern Brazil (Pulmonata: Lymnacidæ). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.77, p. 437-443, 1982.
122. PARAENSE, W.L. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distributional outline. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, p: 181-188, 1982.
123. PÉREZ, J.; MARTÍN de las MULAS, J.; CARRASCO, L.; GUTIERREZ, P.N.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; MARTINEZ-MORENO, A. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. **Journal of Comparative Pathology**, v.120, n.2, p.199-210, 1999.
124. PERRUOLO, G.; PERDOMO, E.; CORONADO, J.S. Estudio de la *Fasciola hepatica* en el estado Tachira, Venezuela. Incidencia y prevalencia en la zona sur del estado Tachila. **Revista Científica UNET**, v.1, n.2, 1987. Disponível: <URL:<http://www.unet.edu.re>> Acesso em: 10.out.2001.
125. PILE, E.; LESSA, C.S.S.; SCHERER, P.O.; SANTOS, J.A.A. dos; VASCONCELOS, M.C. da. Ocorrência de fasciolosis bovina em Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitologia al día**. v..23, n.3-4 1999. Disponível em: <URL:<http://www.scielo.br>> Acesso em: 23.abril.2002
126. POGLEYER, G.; CAPELLI, G.; MARTINI, M.; ZAMPICCOLI, R. Epidemiologia delle parassitosi dell'apparato digerente del bovino nella provincia autónoma di Trento. **Acta della Società Italiana de Buiatria**. v.27, p.483-489, 1995.

127. POLI, A .; ABRAMO, F.; MANCIANTI, F.; NIGRO, M.; PIERI, S.; BIONDA, A . renal involvement in canine leishmaniasis . A light microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**, v. 57, n. 4, p. 444-452, 1991.
128. QIU, H.; LEO, J. Water buffalo and yak production in China. **Animal Gen. Resour. Inform.**, v. 15, p. 83-99, 1995.
129. QUIGG, R. J.; LIM, A.; HAAS, M.; ALEXANDER, J. J.; HE, C.; CARROLL, M. C. Immune complex glomerulonephritis in C4- and C3- deficient mice. **Kidney International**, v. 53, n. 2, p. 320-330, 1998.
130. RAMOS, A.M.; ROMERO,H.Q.; MOLINA,C.G.; MARTÍNEZ,M.H. Frecuencia de fasciolosis através de cuatro técnicas de diagnósticos en toros sacrificados en la plaza México. **Veterinaria México**, v. 24, n,3, p. 239-241, 1993.
131. RAMOS, E. A . G.; ANDRADE, Z. A . Chronic glomerulonephritis associated with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 29, p. 162-167, 1987.
132. REINECKE,R.K. **Veterinary Helminthology**, Butterworth Publishers, p.249-260, 1983.
133. REY,L. *Fasciola hepatica* no gado do Rio Grande do Sul. Investigações sobre a possibilidade de ocorrência de casos humanos. **Revista Bras. De Mal. e Doenças Trop.**, v.9, n.4, p. 473-483, 1957.
134. REZENDE,H.E.B. de. Retrospectiva de fasciolose bovina no Brasil. In: Seminário Nacional Sobre Parasitoses dos Bovinos, 1979, Campo Grande. **Resumos**. Campo Grande : Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/ Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, 1979, p..133-143.
135. ROBINSON, A .; LEWERT, R. M. ; SPARGO, B. H. Immune complex glomerulonephritis and amyloidosis in *Schistosoma japonicum* infected rabbits. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, p. 214-226, 1982.
136. ROITT,I.; BROSTOFF,J.; MALE,D. Hipersensibilidade tipo III In: Imunologia, cap.24, p.24.1-24.12. 4 Ed., **Ed.Monde**, 1997.
137. ROSS, J. G.; DOW, C.; TODD, J. R. A study of *Fasciola hepatica* infections in sheep. **Veterinary Record**, v. 80, p. 543-546, 1977.

138. RUIZ, L.J.R.; DURÁN, E.M. Perdas económicas por descomiso de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el estado de Tabasco, México. **Veterinaria México**, v.25, n.4, p.327-331, 1994.
139. SALEHA, A.A. Liver fluke disease (fascioliasis): epidemiology, economic impact and public health significance. **Southeast Asian J. Tropical Medicine and Public Health**, v.22 (suppl), p.361-364, 1991.
140. SANTOS, A .R. dos; GOMES, M.J.T.M.; CASTRO, E.S. de; BASTOS, C.D. Ocorrência de *Fasciola hepatica* em bovinos da Grande Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.21, n.3, p. 119-120, 1999.
141. SANTOS, L.; FRANÇA, F. Descoberta dos primeiros focos dos hospedeiros da *Fasciola hepatica* no estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Higiene, 18, 1970, São Paulo. **Resumos**. São Paulo, 1970. p.102.
142. SARTORI, A .; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COE, J.; CAMPOS-NETO, A . Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. II. Detection and characterization of parasite antigens and antibodies eluted from kidneys of *Leishmania donovani*- infected hamsters. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 87, n. 3, p. 386-392, 1992.
143. SARTORI, A.; OLIVEIRA, A . V. de; ROQUE-BARREIRA, M. C.; ROSSI, M. A .; CAMPOS-NETO, A . Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. **Parasite Immunology**, v. 9, n. 1, p. 93-103, 1987.
144. SCHERER, P. O.; ABIDU, M. ; SANTOS, C. S.; SILVA, P. B. da; BORDIN, E.; FREIRE, N.M. S. Ocorrência e prevalência da *Fasciola hepatica* nas Regiões dos Lagos, Estado do Rio de Janeiro. **Parasitologia al dia**, v. 19, n.1-2, p. 69-71, 1995.
145. SCHWARTZ, M. M. The pathologic diagnosis of renal disease. In: JENNETTE, J. C.; OLSON, J. L.; SCHWARTZ, M. M.; SILVA, F. G. **Heptinstall's pathology of the kidney**, 5. ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers, p. 169-180, 1998.
146. SERRA-FREIRE, N.M. da. Se descuidar, a fascíola mata. **A Granja**, v. 51, n. 564, p. 28-31, 1995. (a)
147. SERRA-FREIRE, N.M. da; NUERMBERG, S. Geopolitical dispersion of the occurrence of *Fasciola hepatica* in the state of Santa Catarina, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, suppl.1, p.263-269, 1992.

148. SERRA-FREIRE, N.M. Fasciola hepática. **A Hora Veterinária**, Ed.extra, n.1, p.13-18, 1995. (b)
149. SERRA-FREIRE, N.M.; BORDIN, E.L.; LESSA, C.S.S.; SCHERER, P.O.; FARIAS, M.T.; MALACCO, M. A .; CORRÊIA, T.C.; TSCHUMI, J.A. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**, Ed. extra, n.1, p.19-21, 1995.
150. SILVA, I.C.C.; MÜLLER, G.; MATTOS, M.J.T.; CASTRO, A . L. D.de; ALMEIDA, J.E.M.; UENO, H. Fasciolose: I . Incidência e importância em bovino e ovinocultura do Rio Grande do Sul. **Lavoura Arrozeira**, v. 33, p.34-42, 1980.
151. SILVA-SANTOS, I. C.; ALBITE SILVA, F. C.; PASCOTINE, L. C. *Lymnaea columella* (Say ,1817) no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 14, n. 80, p. 30-32, 1994.
152. SILVA-SANTOS, I.C.; *Lymnaea columella* Say 1817 interagindo na disseminação da fasciolose na Estação Experimental Zootécnica de Dom Pedrito, RS. **A Hora Veterinária**, v. 6, n. 35, p. 42-48, 1987.
153. SILVA-SANTOS, I.C.; WENDER, F.L. Hospedeiros intermediários da *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 no município de Gramado, Rio Grande do Sul. In: Seminário do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1994, Londrina. **Publicação Avulsa**. Belém: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Londrina, 1994.
154. SINCLAIR, K. B. Pathogenesis of Fasciola and other liver flukes. **Helminthological Abstracts**, v. 36, p. 115-134, 1967.
155. SINNIAH, R.; RUI-MEI, H.; KARA, A . Up-regulation of cytokines in glomerulonephritis associated with immune malaria infection. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 80, n. 2, p. 87-95, 1999.
156. SOBH, M. A.; MOUSTAFA, F, E.; HAMED, S. N.; GHONEIM, M. A. Infectious glomerulopathy induced by a defined agent (*Schistosoma mansoni*): progression despite early elimination of the causal agent. **Experimental Nephrology**, v. 1, n. 4, p. 261-264, 1993. (b)
157. SOBH, M.; MOUSTAFA, F.; EL-ARBAGY, A .; SHEBAB EL-DIN, M.; SHAMAA, S.; AMER, G. Nephropathy in asymptomatic patients with active *Schistosoma mansoni* infection. **International Urol. and Nephrol.**, v. 22, n. 1, p. 37-43, 1980. (a)

158. SONI, J. L.; COX, H. W. Pathogenesis of acute avian malaria. IV. Immunologic factors in nephritis of acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, p. 431-438, 1975.
159. SOULSBY, E.J.L... **Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals**, 7 ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1982. 809p.
160. SOUZA, C. P.; MAGALHÃES, K. G. Rearing of *Lymnaea columella* (Say,1817) intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus,1758). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, 2000. Disponível em: < URL: <http://www.scielo.br>>. Acesso em: 05.fev.2002.
161. SOUZA,C.P. de ; LIMA,L.C.;JANNOTTI-PASSOS,L.K.; Moluscos límnicos da Microregião de Belo Horizonte,MG, com ênfase nos vetores de parasitoses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.5,1998. Disponível em: <URL: <http://www.scielo.br>> Acesso em: 05.fev.2002.
162. SOUZA,R.M. e REBELO,C.A. Ocorrência de parasitos em bovinos na Região do Baixo Vale do Itajaí, Santa Catarina, Florianópolis, **EMPASC**, Comunicado Técnico, 45, 1981. 6 p.
163. SRIHAKIM,S.; PHOLPARK,M. Problem of fascioliasis in animal husbandry in Thailand. **Southeast Asian Journal Trop. Med. Public. Health**, v.22, suppl., p.352-355, 1991.
164. STERZEL, R. B.; EHRICH, J. H.; LUCIA, H.; THOMSON, D.; KASHGARIAN, M. Mesangial disposal of glomerular immune deposits in acute malarial glomerulonephritis in rats. **Laboratory Investigation**, v. 42, n. 2, p. 209-214, 1982.
165. SUÁREZ,L.R.P.; MOLINA,C.G.; ROMERO,H.Q.; BUENO,J.A. Frecuencia de *Fasciola hepatica* en ganaderias de lidia en el estado de Tlaxcala, México. **Veterinaria México**, v.24, n.3, p.235-237, 1993.
166. SUAZO,F.M.; HERNÁNDEZ,E.F.; SORIANO,G.F. Estudio epizootiológico de la fascioliasis en la zona centro del estado de Guerrero. **Técnica. Pecuaria México** , v. 27, n.1, p.41-47, 1989.
167. TAFURI, W. L.; MICHLICK, M. S.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V. H.; BARBOSA, A. J.; BAMBIRRA, E. A. ; COSTA, C. A. da; MELO, M. N.; MAYRINK, W. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 31, n. 3, p. 139-145, 1989.

168. TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R. da; MELO, M. N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 203-212, 2001.
169. TANIMOTO, T.; SHIROTA, K.; OHTSUKI, Y.; ARAKI, K. Eosinophilic proliferative pylephlebitis in the liver of Japanese beef cattle with fascioliasis. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 60, n.10, p.1073-1080, 1998.
170. TELLES, H. M. S.; LEITE, R. P. A. ; RODRIGUES, F. L. Moluscos límnicos de uma área do Alto Araguaia (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 179-183, 1991.
171. THEOFILOPOULOS, A. N.; DIXON, F. J. The biology and detection of immune complexes. **Advances in Immunology**, v. 28, p. 89-220, 1979.
172. TORGERSON, P.; CLAXTON, J. Epidemiology and Control. In: DALTON, J. P. **Fasciolosis**. 1. ed. New York: Cabi Publishing, 1999, cap. 4, p. 113-149.
173. UENO, H.; GUTIERRES, V. C.; MATTOS, M. J. T. de; MULLER, G. Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 11, n. 2-3, p. 185-191, 1982
174. UETA, M. T.. Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Limnaea columella* Say, 1817 no Vale do Paraíba, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública São Paulo**, v. 14, p. 230-233, 1980.
175. URGUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W.. **Veterinary Parasitology**, New York: Churchill Livingstone, 1987. p.100-109.
176. VALLI, V. E.; FURSBERG, C. M. The pathogenesis of *Trypanosoma congolense* infection in calves. V. Quantitative histological changes. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 3, p. 334-368, 1979.
177. WACKER, K.; ROFFEIS, M.; CONRATHS, F. J. Cow-calf herds in eastern Germany: status quo of some parasite species and a comparison of a chemoprophylaxis and pasture management in the control of gastrointestinal nematodes. **Zentralbl. Veterinarmed.**, v. 46, n. 7, p. 475-483, 1999.
178. YADAV, S. C.; SHARMA, R. L.; KALICHARAN, A. ; MELVIA, U. R.; DASS, R. S.; VERMA, A. K.. Primary experimental infection of riverine buffaloes with *Fasciola gigantica*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 285-296, 1999.

179. YANG, Q.; MAO, W. H.; FERRE, I.; BAYÓN, J. E.; MAO, X. Z.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Plasma aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activities in water buffaloes with experimental subclinical fasciolosis. **Veterinary Parasitology**, v. 78, n. 2, p. 129-136, 1998.
180. YILMA, J. M.; MALONE Jr., J.B. A geographic information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Etiopía. **Veterinary Parasitology**, v. 78, p. 103-127, 1998.

M357g Marques, Sandra Márcia Tietz

Glomerulonefrite na fasciolose bovina e bubalina /
Sandra Márcia Tietz Marques. - Porto Alegre: UFRGS,
2002.

158 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2002. Maria Lúcia Scroferneker, Orient.

1. *Fasciola hepática*. 2. Imunodiagnóstico 3.
Glomerulonefrite 4. Prevalência I. Scroferneker, Maria
Lúcia, Orient. II. Título.

CDD 619.443